Schweizerisches Tropeninstitut, Basel

Zur Oogenese bei *Ornithodorus moubata,* Murray (Ixodoidea: Argasidae) unter besonderer Berücksichtigung der Vitellogenese

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Peter A. Diehl
aus Degersheim/SG

Basel 1970

Verlag für Recht und Gesellschaft A.G., Basel

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. R. Geigy und Dr. W. Stingelin.

Basel, den 10. Februar 1970.

Prof. Dr. S. Fallab
Dekan

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Separatdruck aus Acta Tropica Bd. XXVII, Heft 4, 1970

I. Einleitung 302
II. Material und Methoden 303
III. Resultate 306
A. Morphologie der weiblichen Geschlechtsorgane 306
B. Histologie des Ovars 307
C. Oogenese 307
1. Phase der prämeiotischen Kernvorgänge 308
2. Prävitellogenese 308
2.1. Cytologie der Eizelle 308
2.1.1. Kern 308
2.1.2. Nucleolus 311
2.1.3. Nebenkörperchen 312
2.1.4. Cytoplasma 313
2.1.5. Symbionten 315
2.2. Funiculus 315
3. Vitellogenese 317
3.1. Auslösung der Vitellogenese 317
3.2. Cytologie der Eizelle 317
3.2.1. Kern 317
3.2.2. Nucleolus 318
3.2.3. Nebenkörperchen 319
3.2.4. Cytoplasma 319
3.2.4.1. Bildung des Dotters 319
3.2.4.2. Dünnschichtchromatographie der Eilipide 321
3.2.4.3. Histochemische Untersuchung des Dotters 322
3.2.4.4. Herkunft des Dotters 328
3.2.4.4.1. Trypanblauversuch 329
3.2.4.4.2. Vergleich der Ei- und Hämolymphenproteine . . . 330
3.2.4.5. Bildung der Eischale 335
3.2.4.6. Reticulo- und Periplasma 337
3.2.4.7. Symbionten 338
3.3. Funiculus 338
4. Ovulation und postovulatorische Phase 339
4.1. Ovulationsprozeß 339
4.2. Cytologie der Eizelle 340
4.2.1. Kern 340
4.2.2. Cytoplasma und Paraplasma 341
4.2.3. Symbionten 342
4.2.4. Eischale 342
D. Eipolarität und Hauptachsen des Embryos 343
IV. Diskussion 345
V. Literaturverzeichnis 347
Résumé 353
Summary 354

I. Einleitung

Die Oogenese der Tiere ist ein intensiv bearbeitetes Gebiet. Dies ist verständlich im Blick auf die während der Eireifung ablaufenden, cytologisch sehr interessanten Vorgänge wie die Reduktionsteilung, die Bereitstellung von in großen Mengen benötigten Cytoplasmabestandteilen, die Dotterentstehung und die Eischalenbildung. Entwicklungsphysiologisch ist interessant, daß offenbar bei manchen Tiergruppen bereits im Ei die Hauptachsen des Embryos angelegt werden (KUEHN, 1965; NETZEL, 1968; RAVEN, 1961). Auch scheinen während der Oogenese gebildete, inaktivierte messenger-RNS und ribosomale RNS an den nach der Befruchtung einsetzenden Proteinsynthesen beteiligt zu sein (DUSPIVA, 1969; HANSEN-DELKESKAMP, 1969). Die Oogenese ist somit innig mit der nachfolgenden Periode der Embryogenese verknüpft.

Bei den Zecken sind nur wenige lichtmikroskopische Arbeiten über die Oogenese erschienen (Ixodiden: BALASHOV, 1964; BONNET, 1907; DAS, 1939; DOUGLAS, 1943; LEES & BEAMENT, 1948; NORDENSKIOELD, 1909; SAMSON, 1909; STELLA, 1938; TILL, 1961. Argasiden: BALASHOV, 1964; CHRISTOPHERS, 1906; LEES & BEAMENT, 1948; ROBINSON & DAVIDSON, 1913 a, 1913 b, 1914; WAGNER-JEVSEENKO, 1958). Zur Erweiterung der Kenntnisse erwies es sich als notwendig, die Oogenese bei *Ornithodorus moubata* mit modernen Methoden wie z. B. der Elektronenmikroskopie und der Histochemie näher zu untersuchen. Die ersten elektronenoptischen Resultate sind bereits erschienen (AESCHLIMANN & HECKER, 1967, 1969). Der Fall von *O. moubata* ist deshalb interessant, weil diese Art (wie noch *O. savigny*) besonders große Eier resp. Dottermengen braucht, da nicht nur der Embryo, sondern auch die Larve vom mitgegebenen Dotter leben.

Besondere Aufmerksamkeit fand die Frage nach der Herkunft des Proteindotters. Eine Reihe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen deutet auf eine doppelte Quelle hin. Bei vielen Oocyten findet neben einer endogenen, intraoocytären Synthese noch eine Aufnahme von exogenem, extraoocytär synthetisiertem Dottermaterial durch Mikropinocytose statt (ANDERSON, 1968; BEAMS & KESSEL, 1963; BEAMS & SEKHON, 1966; DUMONT & ANDERSON, 1967; DROLLER & ROTH, 1966; HINSCH & CONE, 1969; KESSEL, 1966 a, 1966 b, 1968 a, 1968 b; KESSEL & KEMP, 1962; KING, BAILEY & BABBAGE, 1969; KORFSMEIER, 1966; WARTENBERG, 1962, 1964). Nur selten scheint eine endogene Dotterproduktion allein vorzukommen (ANDERSON & HUEBNER, 1968; KESSEL, 1968 c). Viele Oocyten von Insekten erhalten ihren Proteindotter fast ausschließlich aus der exogenen Quelle (AGGARWAL, 1968; ANDERSON, 1964; BEAMS & KESSEL, 1969; BIER, 1963, 1968; BIER & RAMAMURTY, 1964; FAVARD-SÉRÉNO, 1964; HOPKINS & KING, 1966; KESSEL & BEAMS, 1963; KING & AGGARWAL, 1965; RAMAMURTY, 1964; RAMAMURTY & MAJUMDAR, 1967; ROTH & PORTER, 1964; STAY, 1965; TELFER, 1965).

Die zellphysiologisch interessante Hypothese der Aufnahme von bereits synthetisierten Dotterproteinen aus der Hämolymphe in das Ei wurde durch eine Reihe von elektrophoretischen und immunologischen Untersuchungen bestätigt. Es zeigte sich, daß während der Vitellogenese spezifisch weibliche «female proteins» (auch «vitellogenins» genannt) sowohl in der Hämolymphe wie auch im Eidotter auftreten (ADIYODI, 1967; BODNARYK & MORRISON, 1966, 1968; COLES, 1964, 1965; ENGELMANN, 1969; HILL, 1962, 1965; LAMY, 1967; LAUFER, 1960; MILLS, GREENSLADE & COUCH, 1966; NIELSON & MILLS, 1968; ORR, 1964 a, 1964 b; PAN, BELL & TELFER, 1969; SCHEURER, 1969; TELFER, 1965; WILLIAMS, 1965).

Nach den elektronenmikroskopischen Resultaten von AESCHLIMANN & HECKER (1967, 1969) scheint der Proteindotter von *O. moubata* sowohl aus einer endogenen wie aus einer exogenen Quelle zu stammen. Eines der beiden Hauptziele der vorliegenden Arbeit ist es, die Hypothese der exogenen Dotterquelle mit Hilfe von

elektrophoretischen und immunologischen Untersuchungen sowie durch das Studium der Aufnahme von Trypanblau in das Ei zu stützen.

Der Eidotter erweist sich chemisch als sehr komplex (BONHAG, 1958; NATH, 1960; RAVEN, 1961; WILLIAMS, 1965). AESCHLIMANN & HECKER (1967, 1969) beschrieben im Ei von *O. moubata* neben den Dotterschollen noch Lipidvakuolen und Glykogen. Als zweites Hauptziel der Arbeit soll mit den Techniken der Histochemie und der Dünnschichtchromatographie versucht werden, mehr über die chemische Natur des Dotters auszusagen.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. R. GEIGY, danke ich herzlich für seine Unterstützung, sein Interesse an der vorliegenden Arbeit sowie für den Arbeitsplatz am Schweizerischen Tropeninstitut. Herrn PD Dr. A. AESCHLIMANN spreche ich für seine wertvollen Ratschläge und die vielen anregenden Diskussionen meinen besten Dank aus. Zu großem Dank bin ich auch Herrn PD Dr. C. G. HONEGGER für seine zuvorkommende Hilfe und für die zeitweise Überlassung eines Arbeitsplatzes samt den notwendigen Geräten für die Dünnschichtchromatographie und die Elektrophorese verpflichtet. An dieser Stelle gebührt auch meinem Freunde N. WEISS herzlichen Dank für seine Ratschläge bei den immunologischen Arbeiten. Herrn Dr. H. HECKER und Herrn cand. phil. II L. JENNI danke ich für das Überlassen von elektronenmikroskopischen Aufnahmen und von einigen Semidünnschnitten.

II. Material und Methoden

Die Zecken stammen aus dem Ulanga District (Tanzania). Sie werden seit mehreren Jahren am Tropeninstitut nach der von GEIGY & HERBIG (1955) beschriebenen Methode gezüchtet und von Zeit zu Zeit durch Frischimporte ergänzt. Die Blutmahlzeit erfolgt auf Meerschweinchen. Die Temperatur des Zuchtraums beträgt etwa 25–26° C, die relative Luftfeuchtigkeit ca. 70–80%.

Die angewandten histologischen und histochemischen Techniken finden sich in den Handbüchern von KISZELY-PÓSALAKY (1964), PEARSE (1961, 1968), ROMEIS (1968) und RUTHMANN (1966).

Die Fixierung der Geschlechtsorgane erfolgte je nach späterem Verwendungszweck in Boin-Dubosq, wäßrigem Bouin, Carnoy, LILLIE's AAF, Lison-Vokaer, LILLIE's alkoholischem Pb-Nitrat, Zenker, Susa, neutralem 4%- und 10%-Formalin und Ca-Formol nach BAKER mit und ohne anschließende Chrombehandlung.

Für die Paraffinhistologie wurden die Objekte über Butanol in Paraffin (Smp. 56° C) übergeführt. Durch die Einbettung wurden dotterhaltige Eier hart und spröde. Sie ließen sich trotzdem schneiden, wenn vor jedem Schnitt die Blockoberfläche kurze Zeit gewässert oder angehaucht wurde (Schnittdicke 7 μ).

Für die Lipidhistochemie gelangten Kryostatschnitte und Gefrierschnitte von fixierten, in Gelatine eingebetteten Ovarien zur Anwendung. Zur Kontrolle wurden die Schnitte einer Extraktion durch Aceton, heißen Aether, Chloroform-Methanol (2 : 1) oder Pyridin unterworfen. Pyridin-Extraktion nach BAKER erfolgte auch an ganzen Ovarien.

Hämatoxylin und saures Hämalaun mit und ohne Erythrosin wurden für die Übersichtsfärbungen verwendet.

Die Nucleinsäuren wurden mit Hämatoxylin, saurem Hämalaun, Chromalaun-Gallocyanin und Eisenhämatoxylin nach WEIGERT angefärbt. Die DNS wurde mit der Feulgen-Reaktion und der empfindlicheren Fluoreszenzmethode nach STERBA & SCHAEFFNER (1965) nachgewiesen. Ribonuclease (Hersteller Fluka AG) und die Trichloressigsäure-Methode dienten zur Extraktion der RNS aus den Schnitten.

Zum histochemischen Nachweis der Proteine, Kohlenhydrate und Lipide wurden die in Tabelle 1 angegebenen Reaktionen angewandt.

Tabelle 1. Angewandte histochemische Nachweisreaktionen für Proteine, Kohlenhydrate und Lipide

Proteine	Hg-Bromphenolblau-Methode nach BONHAG Tetrazoniummethode nach DANIELLI Ninhydrin-Schiff-Methode nach YASUMA & ITCHIKAWA
Basische Proteine	Fast Green FCF nach ALFERT & GSCHWIND
Kohlenhydrate	PAS-Reaktion nach MCMANUS, mit reversibler Blockierung durch Acetylierung nach LILLIE Für den Nachweis des Glykogens wurden die Schnitte mit Speichel oder Diastase behandelt
Saure Mucopolysaccharide	Alcian Blue-Methoden bei pH 2,5 und pH 1 Alcian Blue CEC-Methode Low iron diamine-Methode nach SPICER High iron diamine-Methode nach SPICER Dialysed iron-Methode nach HALE
Lipide	Oil Red O-Methode Sudan black B-Färbung
Phospholipide	BAKER's acid haematein-Methode Nilblaumethode nach CAIN Nilblausulfat-Methode nach MENSCHIK Cu-Phtalocyanin-Methode nach KLUEVER & BARRERA Phosphormolybdänsäuremethode nach LANDING
Cholesterin und Cholesterinester	Methode nach SCHULTZ
Zuckerhaltige Lipide	Modifizierte BRUCKNER-Reaktion nach DIEZEL
Fettsäuren	HOLCZINGER's Fettsäurentechnik
Demaskierung von Lipoproteinen	Burnt Sudan black B nach BERENBAUM

SH- und SS-Gruppen wurden mit der DDD-Reaktion nachgewiesen, wobei Iodacetat zur Blockierung der SH-Gruppen verwendet wurde. Zur Darstellung der Sulfatgruppen dienten die Benzidinreaktion nach BRACCO & CURTI sowie die Tetrazoniummethode nach GEYER. Sulfat- und Carboxylgruppen wurden mit der Aldehyd-Fuchsin-Methode von HALMI & DAVIES nachgewiesen. Die Methode nach FISHER & LILLIE diente zur milden Methylierung der COOH-Gruppen. Die Demethylierung geschah mit $KMnO_4$ oder der KOH-Verseifung.

Für den Nachweis von hämatinhaltigen Verbindungen wurde die Benzidin-Reaktion nach LOELE gebraucht, wobei Peroxydasen durch Cyanidhemmung (0,01 m) ausgeschlossen wurden.

Die Basophilie der verschiedenen Zellbestandteile wurde mit der Methylenblauextinktion nach DEMPSEY & SINGER bestimmt.

Zum Nachweis der Aufnahme höhermolekularer Stoffe in das Ei diente der semikolloidale saure Farbstoff Trypanblau. Etwa 0,2–0,5 ml der frisch zubereiteten, 0,05% oder 1% wäßrigen Lösung wurde mittels einer Mikropipette durch eine Coxa in das Hämocoel eingespritzt. Die Ovarien wurden in verschiedenen Zeitabständen nach der Injektion herausseziert, in Susa fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Schnitte wurden dann ohne weitere Färbung im Mikroskop ausgewertet. Für Kurzzeitinkubationen wurden Ovarien *in vitro* in die Trypanblaulösung getaucht und dann histologisch weiter verarbeitet.

Die Dünnschichtchromatographie der Eilipide erfolgte nach den Angaben von Honegger (1962 a, 1962 b), Honegger & Freyvogel (1963), Randerath (1965) und Stahl (1967).

Zur Gewinnung der Eilipide wurden Eier aus dem Ovarlumen unter dem Binokular mit einer Mikropipette angestochen und ausgesaugt. Ihr Inhalt wurde lyophilisiert und die Lipide anschließend mit Chloroform : Methanol (2 : 1) extrahiert. Etwa 1 ml Extraktionsmittel wurde pro 50 mg lyophilisiertes Eimaterial verwendet.

Je nach Bedürfnis wurden 1–30 μl Extrakt punkt- oder strichförmig auf vorgereinigte (Chloroform), kurz aktivierte (10′, 110° C) Kieselgel G-Platten (Merck AG) aufgetragen und bei Kammersättigung aufgetrennt. Die Laufstrecke betrug 10 cm. Als Laufmittel wurden Chloroform : Methanol : 2,5 n NH_3 = 60 : 35 : 8 (Laufmittel 1), Chloroform : Methanol : H_2O = 65 : 25 : 4 (Laufmittel 2), Chloroform (Laufmittel 3) und Tetrachlorkohlenstoff (Laufmittel 4) verwendet. Chloroform, Methanol und Tetrachlorkohlenstoff wurden vor Gebrauch frisch destilliert, da sie teilweise erhebliche Verunreinigungen enthielten.

Zur Anfärbung der Flecke dienten Phosphormolybdänsäure, Rhodamin B, Ninhydrin, Kaliumwismuthjodid, Orcin-H_2SO_4 sowie das Schiff- und das Zinzade-Reagens. Die gelbliche Untergrundfärbung nach Anwendung der Phosphormolybdänsäure wurde mittels NH_3-Dämpfen entfernt.

Als bekannte Vergleichssubstanzen wurden Lysolecithin, Lecithin, Kephalin, Triolein, Cholesterin, Cholesterinstearat und Squalen mit aufgetrennt.

Die Auftrennung der Ei- und Hämolymphenproteine erfolgte mittels der Polyacrylamidgel-discelektrophorese nach Clarke (1964). Zur Gewinnung der Hämolymphe wurde den Zecken das vierte Beinpaar auf der Höhe der Coxa abgeschnitten und die austretende Flüssigkeit mittels Mikropipetten von 1 μl Inhalt aufgenommen. Die gewünschte Menge Hämolymphe pro Elektrophoreselauf wurde in 0,1 ml eisgekühlte 4% Saccharoselösung pipettiert und die Hämocyten abzentrifugiert. Anschließend erfolgte sofort die Elektrophorese.

Zur Gewinnung der Eiproteine wurden die Eier in eisgekühlter 4% Saccharoselösung homogenisiert und die Zelltrümmer abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand sofort der Elektrophorese unterworfen.

Die Färbungen der Proteine, Glykoproteine und eisenhaltigen Proteine erfolgten nach den Vorschriften von Clarke (1964). Sudan black B diente zum Nachweis der Lipoproteine (siehe Diehl, 1969). Phospholipide oder Sterole enthaltende Lipoproteine wurden nach den Angaben von Wang & Patton (1968) angefärbt.

Zur Messung des relativen Proteingehaltes wurden die mit Amidoschwarz gefärbten Elektrophoresebanden ausgeschnitten und mit 1 n NaOH eluiert. Die Ablesung der Extinktion erfolgte bei 578 nm gegen das Eluierungsmittel.

Die indirekte Immunofluoreszenzmethode nach Coons diente zur Prüfung der antigenischen Eigenschaften der Ei- und Hämolymphenproteine. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Hämolymphenproteine wurde der unfixierte Gelzylinder der Länge nach auf dem Kryostat geschnitten (Schnittdicke 7 μ). Die Weiterbehandlung erfolgte den Vorschriften entsprechend im ersten Schritt mit Antikörpern gegen Eiproteine, im zweiten Schritt mit fluoreszierenden Antikörpern

gegen Mäureserumproteine (Hersteller Institut Pasteur). Die Auswertung der Resultate geschah mit dem Fluoreszenzmikroskop. Weder das Polyacrylamid noch die Elektrophoresebanden zeigten eine Eigenfluoreszenz.

Die Antikörper gegen Eiproteine wurden hergestellt, indem einer weißen Maus das Homogenisat von je 50 frisch abgelegten Eiern dreimal in Abständen von je 4 Tagen i.p. injiziert wurde. Nach zwei Wochen erfolgte eine weitere Boosterinjektion. 15 Tage darauf wurde das Serum gewonnen.

Die Bestimmung des Wassergehaltes von Eiern geschah durch Lyophilisieren und anschließendes Trocknen bei 120° C über Kalziumchlorid oder Kupfersulfat bis zur Gewichtskonstanz.

Für den Volumenvergleich von Zellen, Kernen und Nucleoli wurden an den Serienschnitten ihre Umrisse mittels des Projektionszeichenapparates auf Papier gezeichnet, ausgeschnitten und gewogen (Romeis, 1968).

III. Resultate

A. Morphologie der weiblichen Geschlechtsorgane

Aeschlimann & Hecker (1967, 1969), Balashov (1964), Burgdorfer (1951), Lees & Beament (1948) und Wagner-Jevseenko (1958) beschrieben die Morphologie des weiblichen Geschlechtsapparates von *Ornithodorus moubata*. Ihre Ergebnisse sollen hier kurz wiederholt werden (siehe Abb. 1). Im hintern Körperabschnitt befindet sich das U-förmige Ovar, das durch die aus der Organoberfläche her-

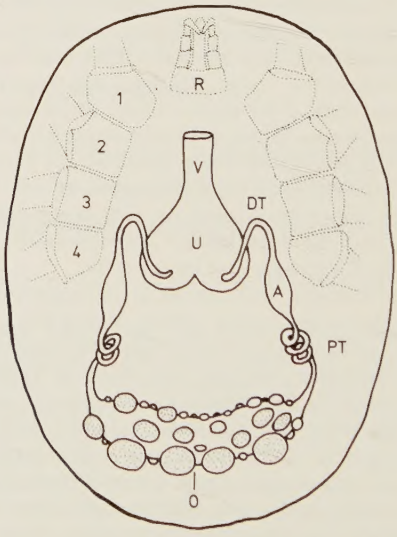


Abb. 1. Schema des weiblichen Geschlechtsapparates von *O. moubata*. V = Vagina; U = Uterus; DT = distaler Teil des Ovidukts; A = Ampulle; PT = proximaler Teil des Ovidukts; O = Ovar; R = Rostrum; 1, 2, 3, 4 = Beinpaare 1–4.

ausragenden Oocyten ein girlandenförmiges Aussehen besitzt. Die an die beiden Ovarenden anschließenden paarigen Ovidukte werden durch eine blasenförmige Erweiterung – die Ampulle – in einen proximalen und in einen distalen Abschnitt geteilt. Sie münden in den zweihörnigen Uterus. Die kurze, anschließende Vagina führt etwa auf der Höhe der Coxae des ersten Beinpaares nach außen. Die Geschlechtsorgane werden von feinen Tracheen umsponnen.

B. Histologie des Ovars

Mehr oder weniger ausführliche Beschreibungen der Histologie des Ovars von *O. moubata* finden sich bei LEES & BEAMENT (1948), WAGNER-JEVSEENKO (1958), BALASHOV (1964) und AESCHLIMANN & HECKER (1967, 1969). Schnitte durch das Ovar eines frisch gehäuteten Weibchens zeigen den histologischen Aufbau dieses Hohlorgans (Abb. 2, 3, 6, 8 und 9). Ein bis zu mehreren Zellagen breites Ovarepithel (Ovarwand) umschließt das zentrale Ovarlumen. Es setzt sich aus Epithelzellen, Oogonien und verschieden großen Oocyten I zusammen. Die Oogonien findet man überall zwischen den Epithelzellen, häufiger aber im rostralen, dem Uterus zugewandten Bereich (Keimzone, Abb. 2). Die größeren Oocyten I ragen weit aus der Organoberfläche heraus und sind nur durch ein Band aus wenigen Zellen («Funiculus») mit der Ovarwand verbunden (Abb. 9). Eine dünne Basallamina begrenzt das Ovar und die Oocyten gegen das Hämocoel. Somit sind die Eier nicht von Follikelzellen umgeben, wie das bei Krebsen (KESSEL, 1968 c) oder Insekten (WEBER, 1966) der Fall ist. An der Außenseite der Basallamina sind verstreut einzelne Zellen angeheftet (Abb. 9). Elektronenmikroskopisch erweisen sie sich als Muskelzellen mit nicht stark ausgeprägter Querstreifung (HECKER, mündliche Mitteilung). Feine Tracheen führen in die Ovarwand.

Ähnlich aufgebaute tubuläre Ovarien finden sich sowohl bei den bisher untersuchten Zecken (siehe z. B. BALASHOV, 1964) wie auch bei Vertretern der Xiphosura, Araneae, Opiliones und Acari (GRASSÉ, 1949).

C. Oogenese

Die Oogenese soll in vier Abschnitte gegliedert werden:

1. Phase der prämeiotischen Kernvorgänge.
2. Phase des Cytoplasmawachstums (Prävitellogenese).
3. Phase der Dotterbildung (Vitellogenese).
4. Ovulation und postovulatorische Phase.

1. Phase der prämeiotischen Kernvorgänge

Die meiotischen Prophasestadien der Eier wurden von WAGNER-JEVSEENKO (1958) ausführlich beschrieben. Die Autorin beobachtete in der Ovarwand mitotische Teilungen der Oogonien (Kerndurchmesser $\sim 6\,\mu$), aus denen die jungen Oocyten I hervorgehen. Die Oocytenkerne erreichen über das Leptotän, Zygotän, Pachytän und Diplotän das Diakinesestadium, bei dem die stark kontrahierten, feulgenpositiven Chromosomen an der Kernperipherie liegen (Abb. 6). Die Kerne vergrößern sich dabei leicht (Kerndurchmesser im Diakinesestadium ~ 7–$8\,\mu$); das Zellvolumen verändert sich nicht meßbar.

Die Oocyten entstehen überall im ganzen Bereich des Ovars, vornehmlich jedoch im rostralen, dem Uterus zugewandten Bereich (Keimzone nach WAGNER-JEVSEENKO [1958]). Sie sind leicht von den Ovarwandzellen zu unterscheiden, da die Zellkerne der letzteren etwas kleiner sind und unregelmäßig verteiltes Heterochromatin sowie einen oder zwei kleine Nucleoli enthalten (Abb. 6).

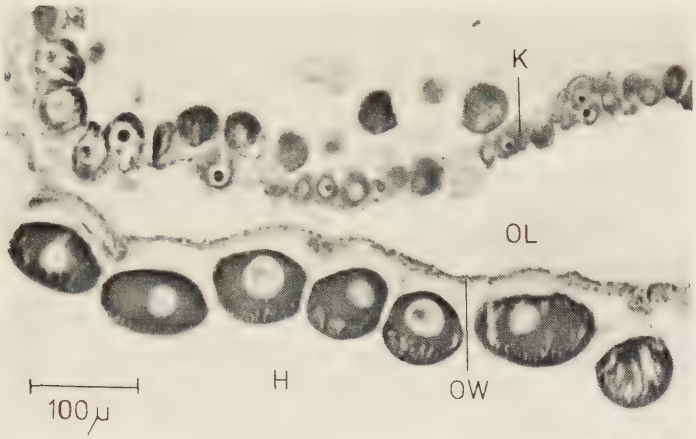
2. Prävitellogenese (Phase des Cytoplasmawachstums)

Die meisten Beobachtungen von WAGNER-JEVSEENKO (1958) können bestätigt werden; gewisse Resultate jedoch werden anders interpretiert.

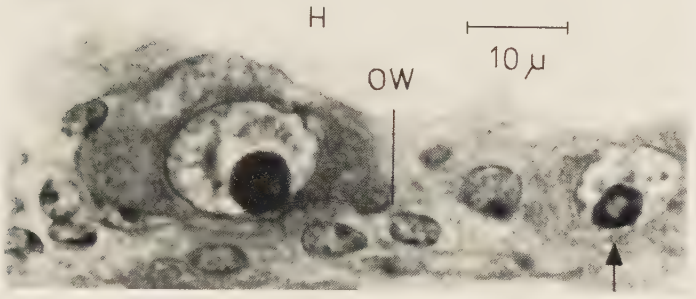
2.1. Cytologie der Eizelle

2.1.1. Kern

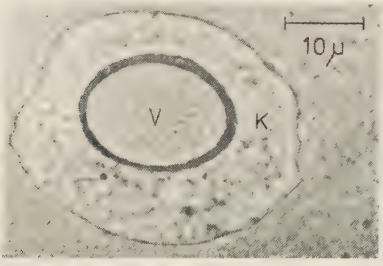
Am Ende der Prophase der ersten Reifeteilung verwandelt sich der Eikern in einen ausgesprochenen «Arbeitskern» mit rein vegetativer Funktion. Mit dem Beginn der Nucleolusbildung und einer in der Folge bedeutenden Kernvolumenzunahme verlieren die Diakinesechromosomen nach und nach ihre Färbbarkeit. Sie gehen in einen euchromatischen Zustand über (Abb. 3, 4 und 6). Das Karyoplasma erscheint dann im fixierten Zustand fibrillär-granulär und mit Hämalaun, WEIGERT'schem Hämatoxylin und Chromalaun-Gallocyanin leicht graublau angefärbt (Abb. 4). Im lebenden Zustand (Phasenkontrastmikroskop) besitzt der runde Kern einen optisch leeren, homogenen Aspekt. Weder mit der Feulgenreaktion noch mit der empfindlicheren Pseudoisocyaninchlorid-Fluoreszenzmethode nach STERBA & SCHAEFFNER (1965) ist DNS nachzuweisen. Dieser auf eine starke Entspiralisierung der DNS zurückzuführende negative Nachweis wird oft bei Oocytenkernen beobachtet (z. B. ARNDT, 1960; BIER, 1968; RAVEN, 1961; STERBA & SCHAEFFNER,



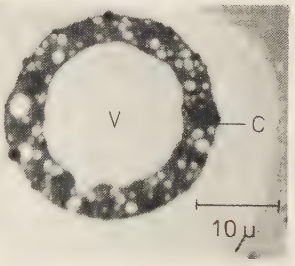
2



3



4



5

Abb. 2. Schnitt durch das Ovar eines frisch geschlüpften Weibchens. K = Keimzone mit jungen Oocyten I; OL = Ovarlumen; OW = Ovarwand. Die älteren, basophilen Oocyten I ragen in das Hämocoel (H) hinein. Fix.: Carnoy; Färb.: saures Hämalaun.

Abb. 3. Beginnende Vakuolisierung des Nucleolus (→). OW = Ovarwandzellen; H = Hämocoel. Fix.: Carnoy; Färb.: Chromalaun-Gallocyanin.

Abb. 4. Euchromatischer Oocytenkern (K) am Ende der Prävitellogenese. Der Nucleolus enthält eine große Zentralvakuole (V) mit fein granulärem Inhalt. Fix.: Carnoy; Färb.: Chromalaun-Gallocyanin.

Abb. 5. Der basophile Cortex (C) des Nucleolus enthält weitere kleine Vakuolen. V = Zentralvakuole. Semidünnschnitt (L. Jenni).

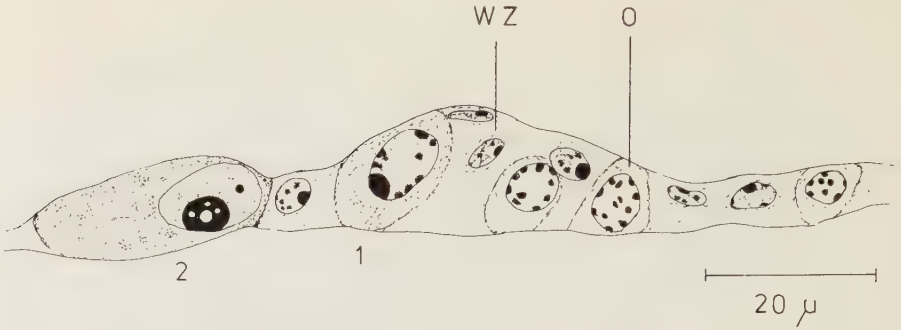


Abb. 6. Junge Oocyten I (O) zwischen Ovarwandzellen (WZ). Bei 1 bildet der Kern einen peripher liegenden Nucleolus aus. Bei 2 vakuolisiert sich der Nucleolus. Im euchromatischen Karyoplasma befindet sich ein basophiles Nebenkörperchen. Fix.: Carnoy; Färb.: Chromalaun-Gallocyanin.

1965). Möglicherweise ist auch ein Teil der DNS durch Proteine blokkiert und deshalb nicht nachweisbar (STERBA & SCHAEFFNER, 1965). Die DNS liegt in einer Form und Konzentration vor, die sich unter der Empfindlichkeitsgrenze der relativ groben Nachweismethoden befindet. Auch elektronenmikroskopisch konnten keine Chromosomen dargestellt werden (AESCHLIMANN & HECKER, 1967, 1969).

Während der Prävitellogenese erfährt der Kern eine starke Volumenvergrößerung um etwa das Tausendfache (Abb. 7). Kurz vor der Dottereinlagerung besitzt er einen Durchmesser von ca. 50 µ. Gegen

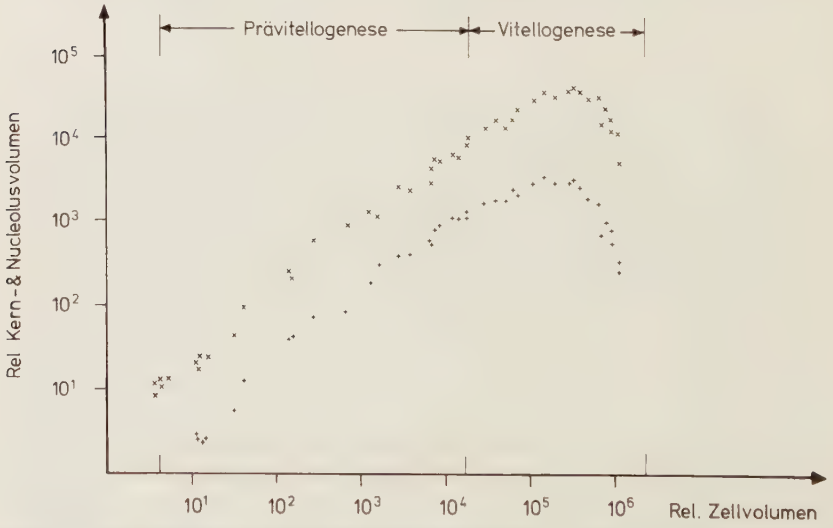


Abb. 7. Veränderungen des relativen Kernvolumens (×) und des Nucleolusvolumens (+) im Verlauf der Prävitellogenese und der Vitellogenese. Die Kurven wurden an Carnoy-fixierten Ovarien gewonnen.

den Schluß der Prävitellogenese verlagert er sich an die Eiperipherie beim Funiculus (Abb. 8 und 9). Diese periphere Lage wird bis weit in die postovulatorische Phase hinein beibehalten werden. Dadurch erhält die Oocyte eine Polarisierung.

Nach WAGNER-JEVSEENKO (1958) treten während der Auflösung der Diakinesechromosomen feulgenpositive Ringe, Klümpchen und Stäbchen über dem Nucleolus auf, die in der Folge aus dem Kernraum verschwinden und sich im Cytoplasma als feine Körnelung ansammeln. Die Autorin schloß daraus, daß die Kern-DNS ins Cytoplasma gelangt. Dies würde auch den feulgennegativ reagierenden Kern erklären. Es handelt sich bei diesem feulgenpositiven Material aber um die DNS von perinucleär gelegenen Symbionten und nicht um Chromosomensubstanz des Eikerns (siehe auch BUCHNER, 1965).

2.1.2. Nucleolus

Der basophile Nucleolus erscheint mit dem Beginn der Kernvolumenvergrößerung und der allmählichen Auflösung der Diakinesechromosomen. Er liegt zuerst an der Kernperipherie (Abb. 3 und 6), verlagert sich dann aber in das Kerninnere, wobei er eine rundliche Form annimmt (Abb. 8 und 9). Ebenso wie der Kern erfährt der Nucleolus im Verlauf der Prävitellogenese eine große Volumenzunahme (Abb. 7). Dies ist in erster Linie auf eine starke Vakuolisierung zurückzuführen. Kurz nach Verlagerung ins Kerninnere bildet der Nucleolus eine große, zentral gelegene Vakuole aus, deren leicht acidophiler Inhalt im fixierten Zustande feiner granuliert als das Karyoplasma er-

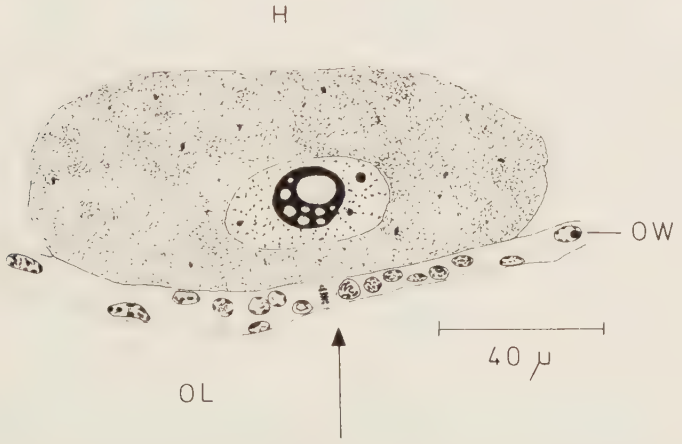


Abb. 8. Durch die starke Volumenzunahme während der Prävitellogenese ragt die Oocyte I ins Hämocoel (H) hinein. Die an die Eizelle angrenzenden Ovarwandzellen (OW) beginnen sich zu teilen (→). OL = Ovarlumen. Fix.: Carnoy; Färb.: Chromalaun-Gallocyanin.

scheint. Die starke Basophilie wird dadurch auf einen peripheren, schmalen Bereich (Cortex) beschränkt (Abb. 4). Mit zunehmender Größe des Nucleolus erscheinen dann auch im Cortex selbst kleinere, acidophile Vakuolen (Abb. 5).

Am Ende der Prävitellogenese, vor der Dotterbildung, erreicht der Nucleolus einen Durchmesser von etwa 30 μ. Er liegt meist im Kerninnern, kann aber öfters auch nahe der Kernperipherie beobachtet werden. Seine Lage im Kern scheint demnach nicht fixiert zu sein.

2.1.3. Nebenkörperchen

Mit beginnender Vergrößerung des Nucleolus treten im Karyoplasma rundliche basophile Körperchen auf (Abb. 6, 8, 9, 10 und 12). Ihre Anzahl pro Kern ist variabel (bis max. 15). Ihr Durchmesser kann bis zu 6 μ betragen. Solche Nebenkörperchen treten oft in Oocytenkernen auf (Raven, 1961). Wie im Kapitel der Vitellogenese näher beschrie-

Abb. 9. Der am Ende der Prävitellogenese fertig ausgebildete Funiculus (F) verbindet die Oocyte I mit der Ovarwand (OW). Der Eikern befindet sich beim Funiculus; die Symbionten (S) sind an der entgegengesetzten Eiperipherie versammelt. Im Kernplasma sind drei basophile Nebenkörperchen vorhanden. Vereinzelt sind Muskelzellen (MZ) an der dem Hämocoel (H) zugewandten Ovaroberfläche angeheftet. OL = Ovarlumen. Fix.: Carnoy; Färb.: Chromalaun-Gallocyanin.

ben werden soll, handelt es sich dabei nicht um heterochromatische Kernregionen, sondern um Ansammlungen von Ribonucleoproteinen. AESCHLIMANN & HECKER (1967) haben diese Gebilde als «corps secondaires» bezeichnet, ohne darauf näher einzugehen. Sie stellen Konzentrationen von Granula dar, die etwa die Größe von Cytoplasmaribosomen besitzen. Es sind wahrscheinlich ribosomale Vorstufen.

Die Entstehung dieser Nebenkörperchen aus dem Nucleolus konnte nicht beobachtet werden; man findet jedoch häufig einzelne direkt an der Nucleolusperipherie. Ebenso konnte nie eine Passage der Nebenkörperchen durch die Kernwand ins Cytoplasma gesehen werden, für die es viele Beobachtungen bei anderen Oocyten gibt (RAVEN, 1961). Die Ausschleusung des ribosomalen Materials in das Cytoplasma geschieht wahrscheinlich nur auf elektronenoptisch sichtbarem Niveau durch die Kernporen (AESCHLIMANN & HECKER, 1969).

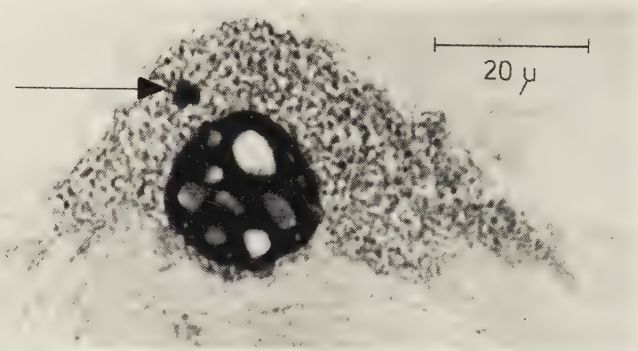
2.1.4. Cytoplasma

Während der Prävitellogenese vergrößert sich das Zellvolumen der Oocyte außerordentlich stark um das ca. 10^4fache (Abb. 7). Diese Volumenzunahme beginnt etwa mit dem Auftreten und der Vakuolisierung des Nucleolus resp. mit dem Erscheinen der Nebenkörperchen. Das Cytoplasma wird dabei stark basophil (Abb. 3, 6, 8 und 9) und ergibt histochemisch eine Proteinreaktion. Die Basophilie verschwindet nach Ribonuclease- oder Trichloressigsäurebehandlung bis auf eine feine Tüpfelung, die von der Symbionten-DNS herstammt. Dieses färberische Verhalten deutet auf einen starken Ribosomengehalt hin. Der Befund wird durch die elektronenoptischen Arbeiten von AESCHLIMANN & HECKER (1967, 1969) gestützt: neben Mitochondrien, ER-Vesikeln und Golgizonen besitzt das Cytoplasma sehr viele freie Ribosomen. Das etwa gleichzeitige Auftreten der ausgeprägten Cytoplasmabasophilie mit der Ausbildung des Nucleolus ist nicht zufällig. Es ist bekannt, daß der Nucleolus der Ort der ribosomalen RNS-Synthese ist (BERNHARD & GRANBOULAN, 1968; HAY, 1968).

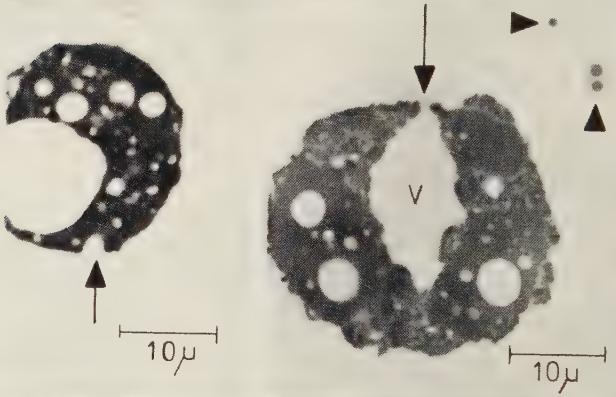
Bedingt durch die enorme Volumenzunahme wächst die Eizelle aus der Ovaroberfläche heraus ins Hämocoel (extraovarielle Lage). Am Ende der Prävitellogenese ist sie nur durch den Funiculus aus wenigen Zellen mit dem Ovar verbunden (Abb. 8 und 9). Sie wird nur durch eine dünne Basallamina von der Hämolymphe getrennt.

Die ursprüngliche Kern-Plasma-Relation von ca. 1 : 4 (Oogonien) wird zugunsten des Cytoplasmas verschoben. Sie beträgt am Ende der Prävitellogenese etwa 1 : 18–1 : 20 (Carnoy-fixierte Präparate).

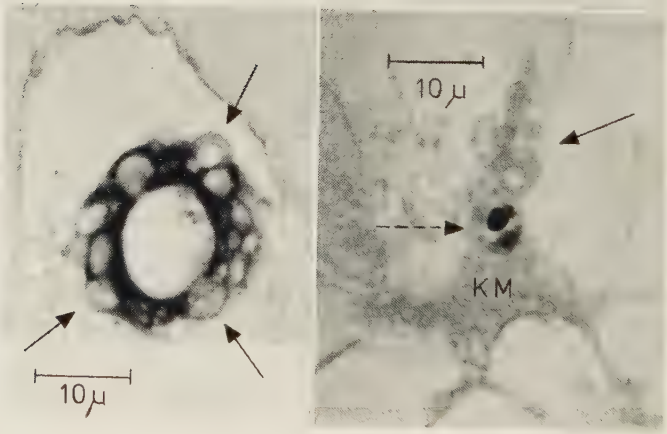
Ein Dotterkern (oder Nebenkern), wie er bei gewissen Oocyten von Seeigeln, Schwertschwänzen, Spinnen, Tausendfüßlern, Insekten und Amphibien auftritt (GRASSÉ, 1949; KUEHN, 1965; JACQUIERT, 1936;



10



11 12



13 14

Abb. 10. Während der Vitellogenese nimmt der anfänglich runde Eikern eine unregelmäßige Form an. Im Kernplasma ist ein basophiles Kernkörperchen sichtbar (→). Fix.: Carnoy; Färb.: Chromalaun-Gallocyanin.

Abb. 11. Tangentialschnitt des Nucleolus. Verbindung (→) einer Vakuole des Nucleoluscortex mit dem Kernraum. Semidünnschnitt: L. Jenni.

RAVEN, 1961; WILLIAMS, 1965), wurde nie bei *Ornithodorus moubata* aufgefunden.

2.1.5. Symbionten

Während der Prävitellogenese vermehren sich die Symbionten und verteilen sich im Cytoplasma (siehe auch BUCHNER, 1965). Gegen das Ende dieser Periode beginnen sie sich an der dem Funiculus resp. dem Eikern diametral entgegengesetzten Eiperipherie zu konzentrieren (Abb. 9). WAGNER-JEVSEENKO (1958) interpretierte die feulgenpositiven Symbionten als Oocytenkernmaterial. Der Feinbau dieser rickettsaartigen Mikroorganismen wurde von HECKER, AESCHLIMANN & BURCKHARDT (1968) beschrieben.

2.2. Funiculus

Nachdem die Oocyte eine gewisse Größe erreicht hat und bereits zur Organoberfläche herausragt, beginnen sich die unterliegenden Ovarepithelzellen zu teilen. In der Folge bildet sich zwischen Ovarepithel und der wachsenden Oocyte ein schmales, relativ langes einschichtiges Band von hohen, zylinderartigen Zellen aus (Abb. 8 und 9). Dieses ist etwa zwei bis vier Zellagen breit und etwa 40–60 Zellen lang; die Gesamtzahl der Zellen beträgt etwa 110–220. Auf Querschnitten durch dieses bandförmige Gebilde erscheint die Oocyte nur mit wenigen Zellen – stielartig – am Ovar angeheftet (Abb. 18). Das Epithelband wurde deshalb von den früheren Autoren (LEES & BEAMENT, 1948; WAGNER-JEVSEENKO, 1958; AESCHLIMANN & HECKER, 1967, 1969) Funiculus genannt. Das Wort soll beibehalten werden, obwohl es sich nicht um ein stielartiges, sondern um ein schmales, langgestrecktes Gebilde handelt.

Wie diese interessante Induktion der Ovarepithelzellen zur Funiculusbildung erfolgt, bleibt eine ungelöste Frage. Wahrscheinlich geht sie von der sich vergrößernden Oocyte aus.

Die Zellkerne der Funiculuszellen besitzen relativ wenig Heterochromatin. Ihr Durchmesser beträgt etwa 4,5–5 μ. Immer ist ein großer abgeflachter Nucleolus an der Kernperipherie vorhanden. Ihm gegen-

---

Abb. 12. Tangentialschnitt des Nucleolus. Verbindung (→) der Zentralvakuole (V) des Nucleolus mit dem Kernraum. Im Nucleoplasma sind drei Nebenkörperchen (▶) vorhanden. Semidünnschnitt: L. Jenni.

Abb. 13. Gegen das Ende der Vitellogenese verliert der Nucleoluscortex an einigen Stellen (→) die Basophilie. Fix.: Carnoy; Färb.: saures Hämalaun.

Abb. 14. Späteres Stadium als in Abb. 13. Die Kernmembran ist aufgelöst. Das Kernmaterial (KM) vermischt sich mit dem Retikuloplasma. Im Kernraum sind noch einige acidophile (→) und basophile (↦) Nucleolusfragmente vorhanden. Fix.: Carnoy; Färb.: saures Hämalaun-Eosin.

über, ebenfalls peripher, ist oft ein etwas kleineres Kernkörperchen zu finden. Die Kerne werden sowohl basal in der Nähe des unterliegenden Ovarepithels wie auch apikal bei der Oocyte beobachtet (Abb. 9).

Die leichte Basophilie des Cytoplasmas verschwindet nach Ribonuclease-Behandlung. Sie wird wohl durch die elektronenmikroskopisch nachgewiesenen Ribosomen verursacht (Aeschlimann & Hecker, 1967).

Die Abgrenzung der Funiculuszellen gegen die Oocyte ist lichtmikroskopisch kaum sichtbar. Sowohl die Funiculuszellen wie die Eizelle senden Fortsätze gegeneinander aus und verzahnen sich auf diese Weise gegenseitig (Aeschlimann & Hecker, 1967).

Die Zellgrenzen zwischen den einzelnen Funiculuszellen sind gut sichtbar. Besonders ausgeprägt jedoch erscheinen sie zwischen den Ovarepithelzellen und den daran angehefteten Funiculuszellen (Abb. 9).

Der lange, schmale Funiculus gibt, zusammen mit der Basallamina, der sich entwickelnden Oocyte eine rotationsellipsoidähnliche Form, wobei die große Achse etwa parallel zum Funiculus verläuft (Abb. 8 und 9).

Rückblick auf die Prävitellogenese

Die auffallendsten Veränderungen in der Oocyte I während der Prävitellogenese sind die enormen Volumenvergrößerungen des Kerns, des Nucleolus und des Cytoplasmas. Am Ende dieser Phase ragt die Eizelle weit ins Hämocoel hinein und bleibt nur über den Funiculus mit dem Ovar verbunden (extraovarielle Lage). Sie wird nur durch die dünne Basallamina von der Hämolymphe getrennt.

Der Eikern gelangt nicht aus dem Diakinesestadium in die anschließende Metaphase der ersten Reifungsteilung, sondern verwandelt sich, im Zusammenhang mit der enormen Cytoplasmavermehrung und der dadurch bedingten Belastung des Zellstoffwechsels, in einen gänzlich euchromatischen «Arbeitskern». Der stark vakuolisierte Nucleolus ist an der Produktion des in großen Mengen benötigten ribosomalen Materials beteiligt.

Am Ende der Prävitellogenese weist das Cytoplasma einen großen Gehalt an Ribosomen auf. Zusätzlich sind ER-Vesikel, Golgizonen und Mitochondrien vorhanden (Aeschlimann & Hecker, 1967, 1969). Die Symbionten beginnen sich im dem Eikern diametral gegenüberliegenden Bereich der Eiperipherie zu konzentrieren.

Die Prävitellogenese dient damit der Vorbereitung der Oocyte auf die nun folgende Phase der Dotterbildung, indem in erster Linie die notwendigen Zellorganellen bereitgestellt werden.

3. Vitellogenese

Die Bildungen des Dotters (auch als Paraplasma bezeichnet) und der Eihülle sind die beiden auffallendsten Vorgänge der Vitellogenese. Sie sind von AESCHLIMANN & HECKER (1967, 1969) elektronenmikroskopisch untersucht worden.

3.1. Auslösung der Vitellogenese

AESCHLIMANN (1968) untersuchte die auslösenden Faktoren der Vitellogenese bei *O. moubata*. Seine Resultate sind zusammengefaßt die folgenden. Begattete Weibchen legen nach einer Präovipositionszeit von 9 bis 15 Tagen nach der Blutmahlzeit die ersten Eier ab. Die Gesamtzahl der abgelegten Eier variiert zwischen 60–140 (im Mittel etwa 83). Werden unbegattete Weibchen gefüttert, so kommt es ebenfalls zu einer Vitellogenese, die aber nur sehr langsam und unvollständig abläuft. Diese Periode erstreckt sich über 40–50 Tage; anschließend werden die dotterhaltigen Eier resorbiert. Nur selten kommt es dabei zu einer Eiablage. Werden unbegatteten, aber gefütterten Weibchen Homogenisate von Vesiculae seminales oder von Spermatophoren oder auch lebende Spermiophoren ins Hämocoel injiziert, so zeigen sie eine normale Vitellogenese mit einer Präovipositionszeit von 9 bis 16 Tagen. Noch nicht näher bekannte männliche Substanzen, durch Begattung oder Injektion ins Weibchen eingeführt, wirken also stimulierend und beschleunigend auf die Vitellogenese. Möglicherweise wirken sie über ein endokrines System im Gehirn. Injiziert man nämlich jungfräulichen, gefütterten Weibchen Homogenisate von Gehirnen aus gefütterten, aber begatteten Weibchen, so zeigen sie z. T. eine Eiablage nach einer Präovipositionszeit von 11 bis 15 Tagen.

Für eine normale Vitellogenese scheinen also eine Blutmahlzeit und die während der Kopulation eingeführten männlichen Substanzen resp. ein durch die männlichen Substanzen aktiviertes endokrines System notwendig zu sein.

3.2. Cytologie der Eizelle

3.2.1. Kern

Das Kernvolumen vergrößert sich zunehmend vom Beginn der Dottereinlagerung bis kurz vor Ovulation um etwa das Vier- bis Fünffache. Der Kern erfährt somit eine Gesamtvergrößerung während der Prävitellogenese und Vitellogenese um etwa das 4000–5000fache (Abb. 7). Eine solche starke Aufquellung des Kerns, verbunden mit großer Nucleolustätigkeit und Feulgennegativität, wird bei vielen dotterreichen Oocyten beobachtet (z. B. ARNDT, 1960; RAVEN, 1961;

Sterba & Schaeffner, 1965). Diese Kernvergrößerung kann als Beispiel für ein extremes funktionelles Kernödem aufgefaßt werden, wie dies unter Stoffwechselbelastung bei vielen Zellen auftritt (Grundmann, 1964).

Während im Cytoplasma die Dotterkugeln sich anhäufen, nimmt der anfänglich runde Kern in fortgeschritteneren Stadien eine unregelmäßige Form an (Abb. 10). Kurz vor Beendigung der Vitellogenese beginnt er dann zu schrumpfen (Abb. 7). Die Kernmembran löst sich auf. Das leicht basophile Kernmaterial bleibt zwischen den Dotterkugeln peripher beim Funiculus liegen (Abb. 14).

Während der Vitellogenese ist die Kern-DNS histochemisch nicht nachweisbar. Der Kern zeigt eine positive Reaktion für Proteine. Basiche Proteine sind ebenfalls vorhanden. SH- und SS-Gruppen können nachgewiesen werden. Die Reaktionen für Lipide und Kohlenhydrate fallen alle negativ aus.

3.2.2. Nucleolus

Der Nucleolus kann sich sowohl im Kerninnern wie auch an der Kernperipherie befinden; seine Lage im Kern scheint nicht fest zu sein. Er vergrößert sein Volumen während der Vitellogenese etwa um das Drei- bis Vierfache (Abb. 7). Vor allem die Zentralvakuole scheint zu wachsen, wobei der basophile Cortex zunehmend dünner wird (vgl. Abb. 4 und 5). Auch innerhalb des Cortex nimmt die Vakuolisierung noch zu. Mit den angewandten histologischen Methoden ist es zur Zeit nicht möglich zu entscheiden, ob die Vakuolen untereinander in Verbindung stehen. Semidünnschnitte zeigen an einigen Stellen eine Kommunikation zwischen Vakuolen und dem Kernraum (Abb. 11 und 12). Vielleicht treten solche Verbindungen nur transitorisch mit der (hypothetischen) Abgabe von Vakuoleninhalt in den Kernraum auf.

Eine Vergrößerung und Vakuolisierung des Nucleolus wird bei vielen Zellen (u. a. Oocyten) mit einer hohen Belastung insbesondere des Proteinstoffwechsels angetroffen (Grundmann, 1964; Hoepker, 1953; Raven, 1961; Stich, 1956). Eine Aufklärung der funktionellen Bedeutung dieser Veränderungen scheint in der Literatur zu fehlen. Sie könnte möglicherweise zu einem besseren Verständnis der Funktionen dieser wichtigen Organelle beitragen.

Die Basophilie des Cortex wird durch RNS verursacht; sie verschwindet nach Ribonuclease- oder Trichloressigsäureextraktion. Der Cortex gibt eine starke Reaktion auf Proteine, eine schwache für basische Proteine. Die Färbung für SH-Gruppen ist stark, für SS-Gruppen jedoch schwach. Die leicht eosinophilen Vakuolen geben schwache Reaktionen für Proteine und SH-Gruppen. Weder der Cortex noch die Vakuolen besitzen histochemisch nachweisbare Mengen an Lipiden oder Kohlenhydraten.

Gegen Ende der Vitellogenese – etwa zur gleichen Zeit wie der Kern – beginnt der Nucleolus sich zu verkleinern (Abb. 7). An einzelnen Stellen verliert der Cortex seine Basophilie; zurück bleibt das acidophile Proteingerüst mit den Vakuolen (Abb. 13). Kurz vor der Ovulation beginnt der Nucleolus zu zerfallen. Man findet vakuolisierte, basophile oder acidophile Teile des Cortex im Kernraum (Abb. 14). Kurz vor der Ovulation sind bei den meisten Oocyten nur noch wenige basophile Bruchstücke vorhanden, die z. T. noch vakuolisiert sein können.

Bei diesem Prozeß handelt es sich wohl nicht um eine Abgabe von zellphysiologisch wichtigem nucleolärem Material an das Cytoplasma, sondern eher um die Elimination dieser am Ende der Vitellogenese überflüssig gewordenen Zellorganelle.

3.2.3. Nebenkörperchen

Bis zum Zeitpunkt des Nucleolusabbaues findet man die basophilen Nebenkörperchen im Kernraum vor. Ihre Zahl ist sehr variabel (0 bis 17 pro Kern). Der Durchmesser kann bis zu 7 μ betragen.

Auch in der Phase des Dotteraufbaues wurde weder ihre Entstehung aus dem Nucleolus noch eine Passage durch die Kernmembran gesehen. Abgerundete basophile Körperchen können jedoch in nächster Nähe des Nucleolus und der Kernmembran angetroffen werden. Ihr granuläres Material gelangt vermutlich durch die Kernporen ins Cytoplasma (Aeschlimann & Hecker, 1969).

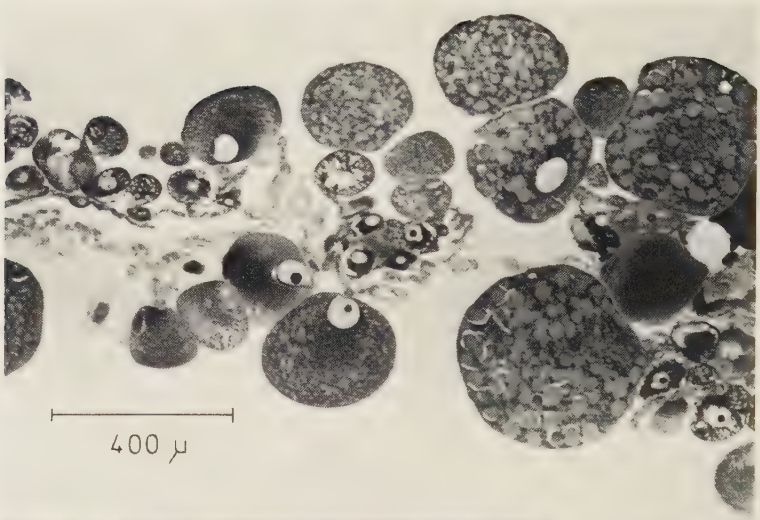
Die Basophilie der Nebenkörperchen verschwindet nach Ribonuclease- oder Trichloressigsäurebehandlung. Sie enthalten Proteine; die Reaktion für basische Proteine ist schwach. Sowohl SH- wie SS-Gruppen sind nachweisbar. Weder Kohlenhydrate noch Lipide sind histochemisch vorhanden. Damit zeigen sie ein ähnliches färberisches Verhalten wie der Nucleoluscortex. Es sind Ribonucleoproteine. Die Nebenkörperchen stellen wahrscheinlich eine intranucleäre Transport- oder Speicherform von ribosomalem Material dar.

3.2.4. Cytoplasma der Eizelle

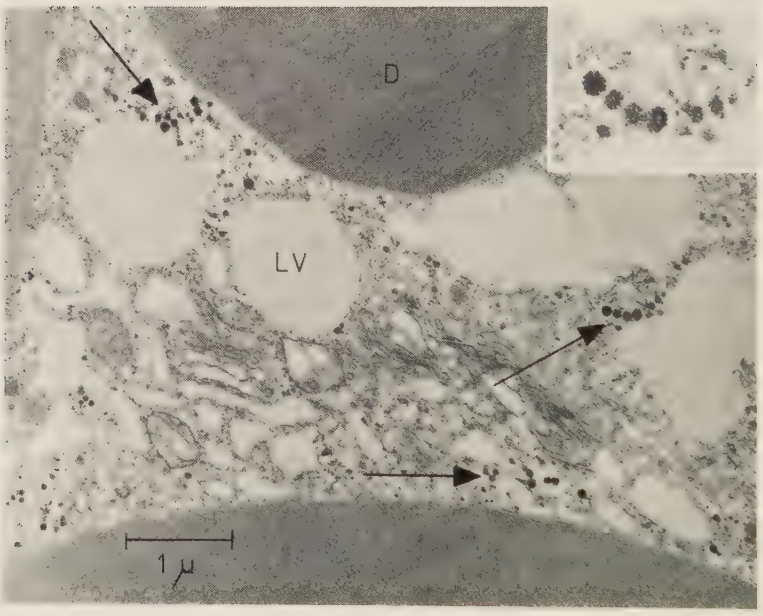
3.2.4.1. Bildung des Dotters

Die Vitellogenese verläuft bei den verschiedenen Eizellen nicht synchron. Schneidet man Ovarien am 10.–15. Tag nach Fütterung und Kopulation, so finden sich nebeneinander alle Entwicklungsstadien von Oogonien bis zu ovulierten Eiern vor (Abb. 15).

Die ersten lichtmikroskopisch sichtbaren Dotterkugeln erscheinen im peripheren Eibereich. In fortgeschritteneren Stadien sind sie etwa gleichmäßig im ganzen Ei verteilt. Sie nehmen im Verlauf der Vitellogenese an Größe zu; die größeren liegen eher peripher (Abb. 18). Kurz



15



16

Abb. 15. Schnitt durch ein Ovar, 10 Tage nach der Blutmahlzeit und der Kopulation. Die Vitellogenese erfolgt nicht synchron; es sind Oocyten I in verschiedenen Entwicklungsstadien vorhanden. Fix.: Lison-Vokaer; Färb.: PAS.

Abb. 16. Schnitt durch eine dotterbildende Oocyte I. Im Retikuloplasma befinden sich zwischen den Dotterkugeln (D) noch lipidhaltige Vakuolen (LV) und Glykogen (→). In der oberen rechten Bildecke befindet sich ein vergrößerter Ausschnitt, der das rosettenförmige Glykogen zeigt. EM-Aufnahme: Dr. H. Hecker.

vor der Ovulation ist die Oocyte mit verschieden großen Dotterschollen vollgepackt. Die Durchmesser der Dotterkugeln schwanken zwischen etwa 1–80 μ.

Gegen Ende der Vitellogenese erfüllt das lichtoptisch kaum sichtbare, eigentliche Cytoplasma den Raum zwischen den dicht gepackten Dotterkugeln (Netz- oder Reticuloplasma). An der Eiperipherie beschränkt es sich auf einen feinen Streifen unter der Eischale (Periplasma).

Durch die großen eingelagerten Dottermengen vermehrt die Oocyte ihr Volumen um ca. das 100–120fache. Damit beträgt ihre Gesamtvolumenvergrößerung während Prävitellogenese und Vitellogenese etwa das 10^6fache (Abb. 7). Die kleine Achse des ovulationsbereiten, rotationsellipsoidförmigen Eies mißt zwischen ca. 760–930 μ, die große Achse zwischen ca. 880–1220 μ.

Die Kern-Zellvolumen-Relation beträgt in der Phase des größten Kernvolumens ca. 1 : 120 bis 1 : 140. Die eigentliche Kern-Plasma-Relation (V Kern : [V Zelle – V Dotter]) ist aus technischen Gründen schwer bestimmbar, liegt aber sicher unter dem Wert für die Kern-Zellvolumen-Relation. Trotzdem darf gesagt werden, daß während der gesamten Entwicklung der Oocyte aus der Oogonie die Kern-Plasma-Relation erheblich zugunsten des Plasmas verschoben wird.

Nach den elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Aeschlimann & Hecker (1967, 1969) baut sich der Dotter aus drei verschiedenen Einschlußarten auf, indem sich zwischen den Dotterkugeln im Netz- und Periplasma noch kleine Lipidvakuolen und rosettenförmiges Glykogen befinden (Abb. 16).

Im folgenden soll nun versucht werden, mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie und der Histochemie mehr über die chemische Natur dieser drei paraplasmatischen Einschlüsse auszusagen. Dabei werden die Untersuchungen auf Proteine, Kohlenhydrate und Lipide beschränkt.

3.2.4.2. Dünnschichtchromatographie der Eilipide

Um erste Anhaltspunkte für die spätere histochemische Untersuchung zu erhalten, wurde eine dünnschichtchromatographische Auftrennung der Eilipide vorgenommen.

Die Resultate müssen mit einem gewissen Vorbehalt betrachtet werden. Da vor der Extraktion der Eiinhalt nicht in Dotter und eigentliches Cytoplasma aufgetrennt wurde, können die Lipide aus beiden Komponenten stammen. Der Volumenanteil des Cytoplasmas ist jedoch derart gering im Vergleich zu dem des Paraplasmas, daß die Hauptmenge der extrahierten Lipide dem Dotter zugeschrieben werden darf.

Im weiteren soll daran erinnert werden, daß eine sichere Identifizierung der Lipide auf Grund des Vergleichs mit Wanderungswerten

von bekannten Testsubstanzen und mit Farbreaktionen nicht möglich ist. Die Dünnschichtchromatographie liefert jedoch immerhin brauchbare Hinweise auf eine mögliche Identität; sie führt nach HONEGGER (1962 b) zu einer sogenannten «chromatographischen Identifizierung».

Mit den vier angewandten Laufmitteln Chloroform : Methanol : 2,5 n NH_3 = 60 : 35 : 8, Chloroform : Methanol : H_2O = 65 : 25 : 4, Chloroform und Tetrachlorkohlenstoff kann der Lipidextrakt aus frisch ovulierten Eiern in 17 Flecke aufgetrennt werden (Abb. 17). Dabei werden die im ersten Laufmittel mitlaufenden ninhydrinpositiven Aminosäuren und evtl. Peptide für die Interpretation nicht berücksichtigt.

Nach Vergleich mit Wanderungswerten von bekannten Substanzen und Anwendung verschiedener Farbreaktionen können acht Flecke chromatographisch näher charakterisiert werden. Bei 1 handelt es sich wohl um Lysolecithin, welches allerdings nur bei Auftragung großer Lipidmengen nachweisbar ist. Fleck 2, ebenfalls nur in kleinen Konzentrationen vorkommend, entspricht färberisch und wanderungswertmäßig Sphingomyelin. Laut chromatographischer Identifizierung sind Fleck 3 Lecithine, 5 Kephaline und Plasmalogene, 9 Cholesterin, 10 Neutralfette (Triglyceride), 11 und 12 Cholesterinester. Diese Flecke sind auch bei geringen aufgetragenen Extraktmengen deutlich zu sehen; die entsprechenden Lipide kommen deshalb vermutlich in größeren Konzentrationen im Ei vor.

Die chemische Natur der übrigen Flecke 4, 6–8 und 13–17 bleibt weitgehend unbekannt. Bei Fleck 4 handelt es sich offenbar um in größeren Mengen vorkommende Schiff-positive Phospholipide; sie laufen vor den Lecithinen mit einem ähnlichen Wanderungswert wie etwa Sulfatide. Die Flecke 6, 7 und 8 sind nur in geringen Mengen vorhanden. Sie besitzen ähnliche Rf-Werte wie Fettsäuren oder Triglyceride mit Hydroxysäuren. 7 ist Schiff-positiv. Nur in ganz geringen Quantitäten scheinen die Flecke 13–17 vorzukommen. 13 und 14 reagieren nicht mit Phosphormolybdänsäure, sind aber im UV-Licht fluoreszierend. 13–17 entsprechen in ihren Wanderungswerten etwa Kohlenwasserstoffen. Zuckerhaltige Lipide konnten nicht nachgewiesen werden.

Nach den dünnschichtchromatographischen Ergebnissen stellen somit Phospholipide, Triglyceride, Cholesterin und Cholesterinester mengenmäßig die wichtigsten Eilipide dar.

3.2.4.3. Histochemische Untersuchung des Dotters

Glykogen

Schon in den Frühstadien der Vitellogenese gibt das Cytoplasma zwischen den ersten lichtoptisch sichtbaren Dotterkugeln eine PAS-positive Reaktion. Im ovulationsbereiten Ei ist die Färbung im Reticulo- und im Periplasma sehr intensiv (Abb. 20). Sie unterbleibt nach

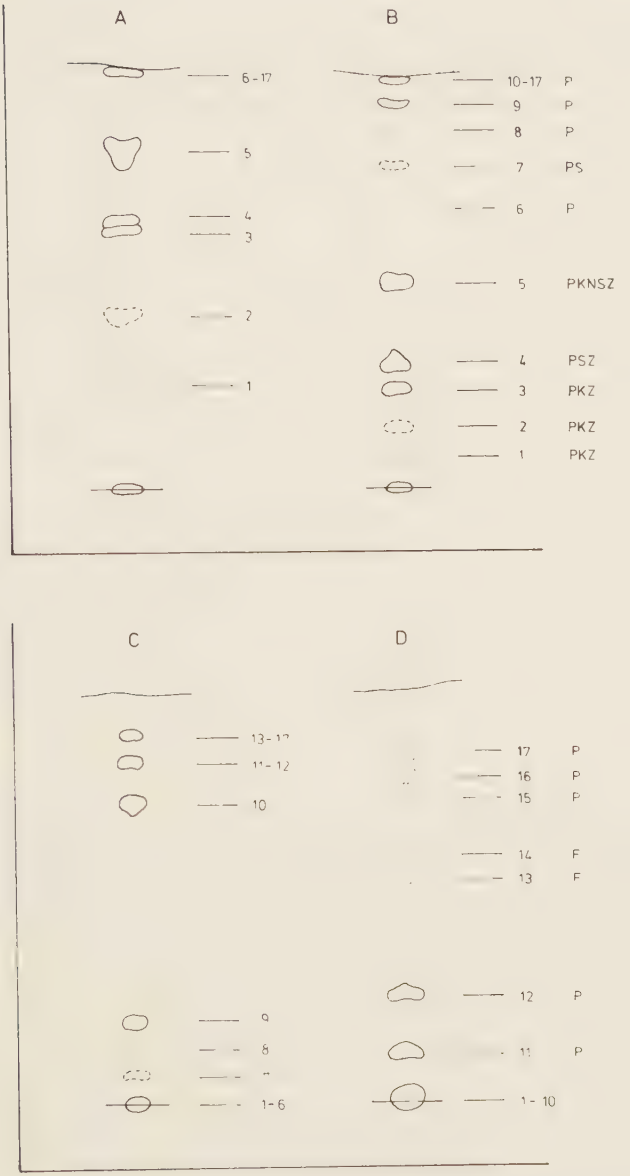


Abb. 17. Dünnschichtchromatogramme der Eilipide aus frisch ovulierten Eiern. Auftrennung im Laufmittel I Chloroform : Methanol : 2,5 n NH_3 = 60 : 35 : 8 (A), im Laufmittel II Chloroform : Methanol : H_2O = 65 : 25 : 4 (B), im Laufmittel III Chloroform (C) und im Laufmittel IV Tetrachlorkohlenstoff (D). Bei B und D ist die Anfärbbarkeit der Flecke aufgeführt. Anfärbung durch: Phosphormolybdänsäure (P), Ninhydrin (N), Kaliumwismuthjodid (K), Schiffreagens (S), Zinzadereagens (Z). Fluoreszierend (F) sind die Flecke 13 und 14.

Speichel- oder Diastasebehandlung (Abb. 21). Sie darf deshalb mit Sicherheit dem Glykogen zugeschrieben werden. Die kräftig ausfallende PAS-Reaktion deutet auf einen hohen Gehalt dieser Reservesubstanz hin. Damit werden die Befunde von AESCHLIMANN & HECKER (1967, 1969) bestätigt; die Autoren beschrieben rosettenförmiges Glykogen im Cytoplasma der Eizelle (Abb. 16).

Lipidvakuolen

Ähnlich dem Glykogen finden sich viele Lipidvakuolen im Netz- und Periplasma zwischen den Dotterkugeln (Abb. 19). Sie erscheinen frühzeitig in der Vitellogenese mit dem Auftreten der ersten kleinen Dotterschollen. Ihr Durchmesser beträgt zwischen 2–4 μ. Dies dürfte allerdings nicht ihrem wahren Wert entsprechen, da bekannt ist, daß Lipidtropfen bei der histologischen Aufarbeitung leicht zusammenfließen und größere Einschlüsse bilden können (KISZELY-PÓSALAKY, 1964).

Die Reaktionen auf Proteine, Kohlenhydrate, Phospholipide, Glykolipide, Fettsäuren, Cholesterin und Cholesterinester fallen negativ aus. Die Lipidvakuolen färben sich dagegen intensiv mit Oil Red O und Sudan black B an (Tabelle 2). Mit den Nilblaumethoden werden sie rosa bis rot angefärbt. Sie werden rasch und vollständig mit kaltem Aceton aus den Schnitten herausgelöst. Aus diesen Ergebnissen darf mit großer Wahrscheinlichkeit auf Triglyceride geschlossen werden (HACK & HELMY, 1967; NATH, 1960).

Dotterkugeln

Die Dotterkugeln zeigen eine starke Proteinreaktion (siehe im folgenden Tabellen 2 und 3). SH- und SS-Gruppen sind vorhanden.

Basische Proteine sind nur nach Trichloressigsäurebehandlung (15 Min. bei 100° C) nachzuweisen. Der Grund dieser Reaktion ist nicht geklärt. Möglicherweise kommt es durch die Behandlung zu einer Freilegung von vorher blockierten basischen Gruppen.

Die virtuelle Methylenblauextinktion erfolgt bei etwa pH 4,2. Die Dotterkugeln sind also schwach basophil.

Die PAS-Reaktion fällt positiv aus (Abb. 20). Sie bleibt negativ ohne vorangehende Perjodatoxydation. Die Färbung ist diastaseresistent und reversibel durch Acetylierung blockierbar. Es ist bekannt, daß gewisse Lipide (Glykolipide, ungesättigte Lipide und Phospholipide) eine positive PAS-Reaktion zu geben vermögen (PEARSE, 1968). Die Färbung wurde deshalb auch an mit Chloroform-Methanol extrahierten Schnitten durchgeführt. Sie ist unverändert positiv. Es darf deshalb der Schluß gezogen werden, daß es sich bei der PAS-positiven Komponente der Dotterkugeln tatsächlich um Kohlenhydrate handelt. Diese sind vermutlich an die Proteine als Glykoproteine gebunden, wie dies bei vielen

Tabelle 2. Ergebnisse der verwendeten Lipoidnachweismethoden bei den Lipidvakuolen und den Dotterkugeln. Dabei sind auch die Resultate nach Extraktion mit Aceton, Aether, Chloroform/Methanol (Chl./Meth.) und Pyridin aufgeführt. + = gut sichtbare Reaktion, (+) = schwache Reaktion, ± = unsichere Reaktion

	Lipidvakuolen nach Extraktion mit					Dotterkugeln nach Extraktion mit				
		Aceton	Aether	Chl./Meth.	Pyridin		Aceton	Aether	Chl./Meth.	Pyridin
Oil Red O	+	–	–	–	–	(+)	–	–	–	–
Sudan black B	+	–	–	–	–	+	(+)	(+)	–	–
Baker's acid haematein	–	–	–	–	–	+	+	+	–	±
Nilblaumethode nach Cain	rot	–	–	–	–	blau	blau	blau	–	–
Nilblausulfat nach Menschik	rot	–	–	–	–	blau	blau	blau	–	–
Cu-Phtalocyanin nach Kluever & Barrera	–	–	–	–	–	+	+	+	–	–
Phosphormolybdänsäuremethode nach Landing	–	–	–	–	–	+	+	+	–	–
Schultz-Reaktion	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
Modifizierte Bruckner-Reaktion nach Diezel	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Holczinger's Fettsäurentechnik	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Burnt Sudan black B nach Berenbaum	+	–	–	–	–	+	+	+	–	±

Tabelle 3. Ergebnisse der verwendeten Nachweisverfahren für Proteine, Kohlenhydrate, Sulfat- und Carboxylgruppen, hämhaltige Verbindungen und Basophiliegrad bei Dotterkugeln und Eischale. + = gut sichtbare Reaktion, (+) = schwache Reaktion

	Dotterkugeln	Eischale
Hg-Bromphenolblau-Methode	+	+
Tetrazoniummethode	+	+
Ninhydrin-Schiff-Methode	+	(+)
Fast Green FCF nach Trichloressigsäure-behandlung (100° C, 15')	+	–
DDD-Reaktion		
SH-Gruppen	+	(+)
SS-Gruppen	(+)	(+)
PAS-Reaktion	+	–
Alcian Blue		
pH 2,5	–	+
pH 1,0	–	–
Alcian Blue CEC (über 1,0 m $MgCl_2$)	–	+
High iron diamine	–	–
Low iron diamine	–	–
Dialysed iron-Methode	–	–
Benzidinreaktion für Sulfatgruppen	–	–
Tetrazoniummethode für Sulfatgruppen	–	–
Aldehydfuchsin für Sulfat- und Carboxylgruppen	+	+
Benzidinmethode für hämhaltige Verbindungen	+	–
Methylenblauextinktion	$\sim$ bei pH 4,2	$\sim$ bei pH 1,8

Eireservesubstanzen der Fall ist (Bonhag, 1958; Raven, 1961; Williams, 1965). Saure Mucopolysaccharide wurden keine nachgewiesen.

Die Dotterkugeln färben sich mit Oil Red O schwach rosa an. Die Färbung bleibt nach Acetonextraktion aus. Dies weist auf einen geringen Gehalt an neutralen Lipiden – möglicherweise Triglyceriden – hin.

Phospholipide sind in größeren Mengen vorhanden. Die verschiedenen Nachweismethoden sind auch nach Extraktion mit Aceton und heißem Äther positiv. Negativ sind sie nach Behandlung mit Chloroform-Methanol und Pyridin.

Cholesterin und Cholesterinester sind vorhanden. Zuckerhaltige Lipide und Fettsäuren sind histochemisch nicht nachweisbar.

Die Methode nach Berenbaum zur Demaskierung von Lipiden in Lipoproteinen liefert keine nennenswert verstärkte Reaktion gegenüber der üblichen Sudan black B-Färbung.

Es wird – auch auf Grund der noch zu beschreibenden elektrophoretischen Resultate – vermutet, daß die nachgewiesenen Lipide an die Glykoproteine gebunden sind (Glyko-lipoproteine).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die histochemisch nachgewiesenen Eilipide (Triglyceride, Phospholipide, Cholesterin und Cho-

lesterinester) gut mit den dünnschichtchromatographisch gefundenen, konzentriert auftretenden Lipiden übereinstimmen. Während die Chromatographie qualitativ mehr auszusagen vermag, gibt die Histochemie eine Lokalisierung der Lipide innerhalb der Oocyte. Die Lipidvakuolen enthalten demnach wahrscheinlich Triglyceride. Die Dotterkugeln weisen neben wenig Triglyceriden noch Phospholipide, Cholesterin und Cholesterinester auf.

Die Benzidin-Reaktion für Hämoglobine und Hämatine ist positiv. Peroxydasen können durch Cyanidhemmung ausgeschlossen werden (Kiszely-Pósalaky, 1964). Damit dürfte der positive Ausfall auf das schon von Wigglesworth (1943) im Ei nachgewiesene alkalische Hämatin zurückzuführen sein. Dieser Farbstoff ist für die Braunfärbung der Dotterkugeln verantwortlich. Es wird vermutet, daß das alkalische Hämatin an die Dotterproteine gebunden ist. Porphyrine und eisenhaltige Porphyrine (Häme) werden leicht an Proteine gekoppelt (Cantarow & Schepartz, 1967).

Nach den histochemischen Ergebnissen besitzen die Dotterkugeln somit eine komplexe chemische Zusammensetzung. Vermutlich sind alkalisches Hämatin, Kohlenhydrate und Lipide an die Proteine gebunden (= Hämo-glyko-lipoproteine).

3.2.4.4. Herkunft des Dotters

Die Glykogengranula und Lipidvakuolen erscheinen frei im Cytoplasma zwischen den Dotterkugeln ohne cytologisch sichtbaren Zusammenhang mit Cytoplasmaorganellen (Aeschlimann & Hecker, 1967, 1969). Ihr Ursprung bleibt unbekannt. Vielleicht wird das Glykogen wie bei Insekten aus Hämolymphenglucose durch die im Cytoplasma lokalisierte Glykogensynthetase aufgebaut (Engels & Bier, 1967). Die Triglyceride der Lipidvakuolen werden möglicherweise unter Beteiligung des ER synthetisiert, wie das für andere Zellen beschrieben ist (Fawcett, 1966; Patt & Patt, 1969).

Während die Herkunft der eben erwähnten Reserveeinschlüsse unbekannt ist, konnte der Ursprung der Dotterkugeln mittels der elektronenmikroskopischen Methode weitgehend abgeklärt werden (Aeschlimann & Hecker, 1967, 1969). Die Oocytenmembran beim ungefütterten, unbegatteten Weibchen erscheint flach und ohne deutliche Oberflächenvergrößerung. Eier, die in Vitellogenese begriffen sind, zeigen dagegen einen ausgeprägten Mikrovillisaum. Am Grunde der Mikrovilli bilden sich Pinocytosebläschen mit elektronendichtem Inhalt (coated vesicles). Diese scheinen sich zu größeren Komplexen (multivesiculated bodies) zu vereinigen, zusammen mit ähnlichen aus ER und Dictyosomen stammenden Bläschen. Die «multivesiculated bodies» werden

dann unter Auflösung der Bläschenmembranen zu homogen erscheinenden Dotterkugeln umgewandelt.

Nach den elektronenoptischen Resultaten besitzen die Dotterschollen im Ei von *O. moubata* somit eine doppelte Herkunft, wie dies bei vielen bisher untersuchten Oocyten der Fall ist (siehe Einleitung). Einerseits werden Reservesubstanzen aus der Hämolymphe aufgenommen (exogene Quelle), anderseits werden sie teilweise innerhalb der Eizelle synthetisiert (endogene Quelle).

Einen ersten Hinweis für eine exogene Dotterquelle lieferte Wigglesworth (1943), indem er aus dem Wirtsblut stammendes alkalisches Hämatin sowohl in der Hämolymphe wie auch im Ei nachwies. Lees & Beament (1948) zeigten, daß größere Moleküle wie Hämoglobin aus dem Hämocoel in das Ei gelangen können.

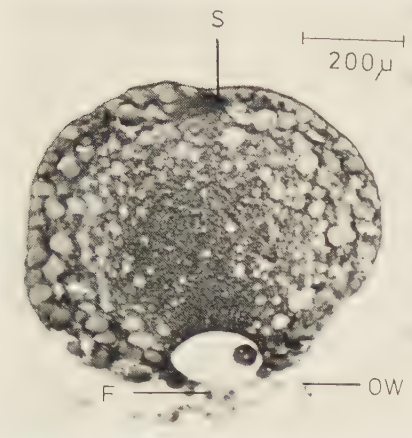
Um nun die Hypothese der exogenen Dotterquelle weiter stützen zu können, wurde in einem ersten Versuch die Aufnahme des sauren Farbstoffs Trypanblau in die Eizelle untersucht. In einem zweiten Experiment wurden die Ei- und Hämolymphenproteine mit Hilfe der Elektrophorese und der Immunofluoreszenz verglichen.

3.2.4.4.1. Trypanblauversuch

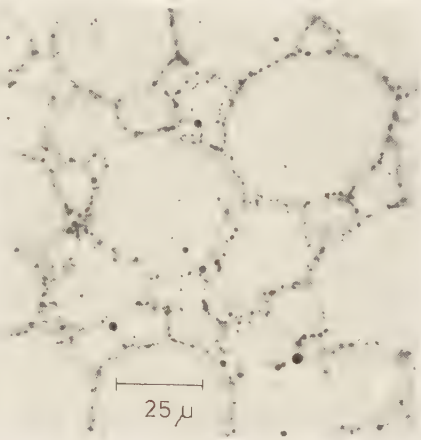
Der semikolloidale saure Farbstoff Trypanblau ist mehrfach als Modellsubstanz zum Nachweis der Aufnahme von höhermolekularen Stoffen in das Ei gebraucht worden (Korfsmeier, 1966; Ramamurty, 1964; Ramamurty & Majumdar, 1967; Sander & Vollmar, 1967). Die Resultate müssen aber mit Vorsicht betrachtet werden; es ist bekannt, daß Trypanblau schädigend auf Zellen zu wirken vermag (Stockinger, 1964). Elektronenmikroskopisch kann sich eine Verringerung des Mikrovillisaums bei Geweben mit pinocytotischer Aktivität zeigen (Schmidt, 1962).

Der Farbstoff wird nicht in Prävitellogenese-Eier aufgenommen. Dagegen erscheint das Trypanblau schon wenige Sekunden nach der Inkubation im peripheren Cytoplasma von Eiern, die sich in Vitellogenese befinden (Abb. 22). Nach 10–20 Minuten befindet sich der Farbstoff im gesamten Peri- und Reticuloplasma. Bereits nach etwa fünf Minuten können einzelne Dotterschollen blau gefärbt sein. Die meisten Dotterkugeln bleiben jedoch auch bei längeren Inkubationszeiten ungefärbt; nur relativ wenige werden «markiert». Nach etwa drei Stunden beginnt das Trypanblau auch in granulärer Form im Cytoplasma und in den Dotterkugeln aufzutreten. Nach 20–24 Stunden findet man einen Teil der Farbstoffgranula in großen Cytoplasmavakuolen eingeschlossen.

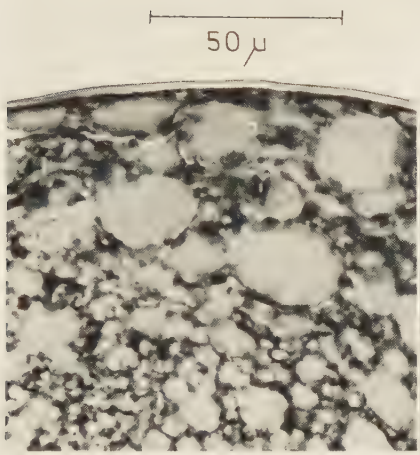
Diese Granulierung und die Cytoplasmavakuolisierung sind vermutlich sichtbarer Ausdruck einer erfolgten Zellschädigung. Es scheint, als ob die anfänglich äußerst schnell und intensiv erfolgende Farbstoffaufnahme bald gehemmt werde. Möglicherweise erfolgt eine Hemmung



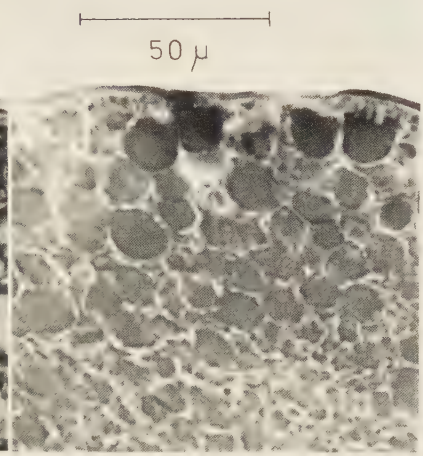
18



19



20



21

Abb. 18. Oocyte I in der Phase der Dotterbildung. Der Kern befindet sich beim Funiculus (F), die Symbionten (S) sind an der diametral entgegengesetzten Eiperipherie versammelt. Die größten Dotterkugeln befinden sich bei der Eiperipherie. OW = Ovarwand. Fix.: Lison-Vokaer; Färb.: PAS.

Abb. 19. Kryostatschnitt durch eine in Gelatine eingebettete Oocyte I. Zwischen den Dotterkugeln befinden sich kleine Lipidtropfen. Fix.: Formol-Ca; Färb.: Oil Red O.

Abb. 20. Zwischen den Dotterschollen befindet sich kräftig angefärbtes Glykogen. Fix.: Lison-Vokaer; Färb.: PAS.

Abb. 21. Nach Diastaseverdauung ist das Glykogen abgebaut. Übrig bleiben die leicht PAS-positiven Dotterkugeln. Fix.: Lison-Vokaer; Färb.: PAS.

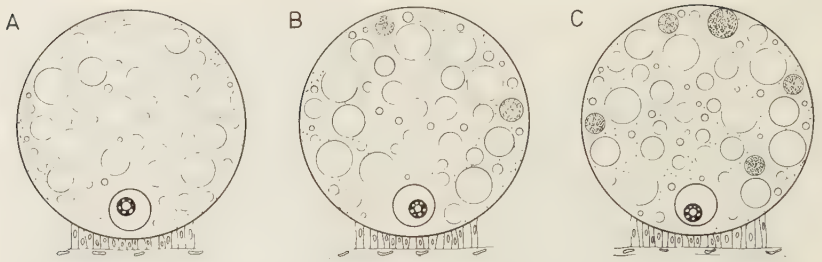


Abb. 22. Schematische Darstellung des Trypanblauversuchs. A: nach 20–30 Sekunden Inkubationszeit erscheint der Farbstoff bereits im peripheren Eicytoplasma. B: nach etwa 5 Minuten können einzelne Dotterkugeln markiert sein. C: nach 10–20 Minuten erfüllt der Farbstoff das gesamte Peri- und Retikuloplasma.

der Pinocytosetätigkeit (vgl. SCHMIDT, 1962). Somit dürfen nur die Resultate von kurzzeitigen, wenige Minuten dauernden Inkubationen betrachtet werden. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß das Trypanblau sehr rasch in Eier der Vitellogenesephase aufgenommen wird. Damit darf der Versuch als Hinweis dafür gewertet werden, daß die Oocyte fähig ist, höhermolekulare Stoffe aufzunehmen.

3.2.4.4.2. Vergleich der Ei- und Hämolymphenproteine

Die Ei- und Hämolymphenproteine wurden mit Hilfe der Disc-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt, um die Hypothese der exogenen Dotterquelle resp. das Vorhandensein von «female proteins» nachzuprüfen. Ein Teil der Ergebnisse ist bereits publiziert worden (DIEHL, 1969).

Hämolymphenproteine

Die Hämolymphe von *O. moubata*-Weibchen wird unter den angewandten experimentellen Bedingungen in 24 Banden aufgetrennt (Abb. 23). VAN SANDE & KARCHER (1960) unterschieden mittels Agargelelektrophorese 12 Fraktionen.

Die Proteinbanden H_1–H_5 sind schwach vertreten (Abb. 23). H_6, H_7 und H_8 sind je nach Zeitabstand zwischen Fütterung und Hämolymphenentnahme verschieden stark konzentriert. Den Farbreaktionen nach zu schließen (siehe Kapitel Material und Methoden) sind H_6, H_7 und H_8 phospholipid- und cholesterinhaltige Glyko-lipoproteine. Zusätzlich enthalten H_6 und H_7 vermutlich alkalisches Hämatin.

Die Banden H_9–H_{15} sind immer deutlich vorhanden. H_{12}–H_{15} scheinen phospholipidhaltige Glyko-lipoproteine zu sein. H_{14} und H_{15} sind wie H_6 und H_7 von bloßem Auge als braune Banden sichtbar. Da die Nachweisreaktion für Häme positiv ausfällt, ist die braune Farbe mit großer Wahrscheinlichkeit auf das von WIGGLESWORTH (1943) in der Hämolymphe beobachtete alkalische Hämatin zurückzuführen. Dieser

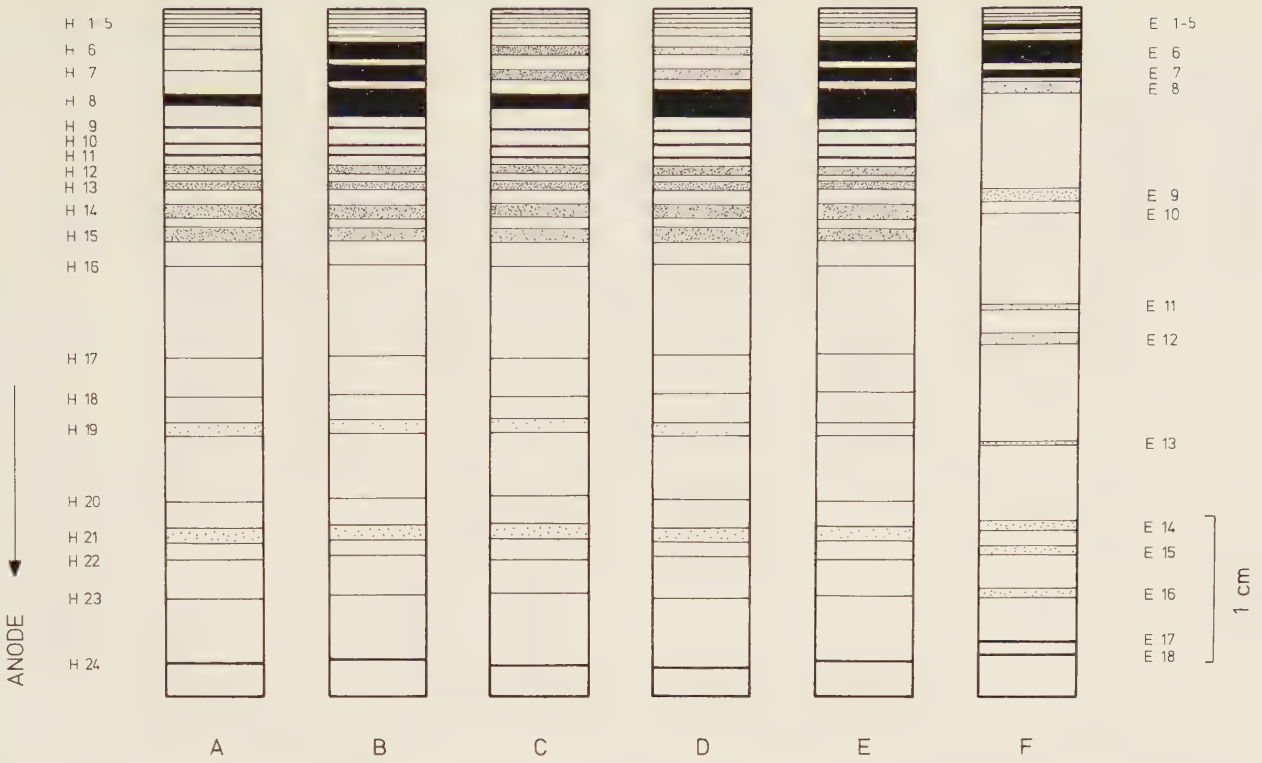


Abb. 23. Elektrophoresemuster der Hämolymphen- und Eiproteine. Aufgetrennte Mengen: 2 μl Hämolymphe resp. der Dotter von 3 Eiern pro Lauf. Laufzeit: 23 Minuten bei einer Spannung von 400 V. Anfärbung: Amidoschwarz. Die unterschiedlichen Grautöne sollen die Konzentrationen der Banden wiedergeben. A: Hämolymphe von ungefütterten, unbegatteten ♀♀. B: von ♀♀, 11 Tage nach Fütterung und Kopulation. C: von ♀♀, eine Woche nach der Eiablage. D: von unbegatteten ♀♀, 11 Tage nach Fütterung. E: von unbegatteten ♀♀, 11 Wochen nach Fütterung. F: Inhalt von frisch ovulierten Eiern.

aus dem Abbau des Wirtsbluts herstammende Farbstoff ist offensichtlich an die Glyko-lipoproteine H_6, H_7, H_{14} und H_{15} gebunden. Bei der Schildzecke *Boophilus microplus* scheint Hämatin ebenfalls an Hämolymphenproteine gekoppelt zu sein (BREMNER, 1959).

H_{16}–H_{23} sind in geringen Konzentrationen vorhanden und können nur bei Auftrennung größerer Hämolymphenmengen dargestellt werden.

Die Frontbande H_{24} ist dagegen immer deutlich zu sehen. Sie verbindet sich mit dem als «tracking dye» beigegebenen Bromphenolblau. Ihre elektrophoretische Beweglichkeit ist etwas größer als die des menschlichen Albumins (Rf-Wert $\sim$ 1,1, bezogen auf Rf-Albumin = 1).

Bei begatteten Weibchen erfahren die Banden H_6, H_7 und H_8 im Verlaufe der Verdauung und der Vitellogenese starke Konzentrationsänderungen, während die übrigen Banden nicht sichtbar beeinflußt zu werden scheinen (Abb. 23 und 24). Frisch geschlüpfte jungfräuliche Weibchen besitzen sehr kleine Konzentrationen an H_6 und H_7, während H_8 deutlich vorhanden ist (Abb. 23 und 24). Während der Verdauung und der Vitellogenese nehmen bei begatteten Weibchen die Konzentrationen der drei Banden sehr stark zu. Während der Eiablage nehmen sie dann wieder ab (Abb. 23 und 24). Bei unbegatteten gefütterten Weibchen nimmt H_8 rasch, H_6 und H_7 jedoch nur sehr langsam zu. Die Kopulation besitzt offensichtlich einen deutlichen Einfluß auf die Konzentrationen der Banden H_6 und H_7 (Abb. 23 und 24).

Männchen zeigen das gleiche Bandenmuster wie frisch geschlüpfte, unbegattete und ungefütterte Weibchen. Während der Verdauung nimmt jedoch nur H_8 an Konzentration zu und wieder ab, ähnlich wie bei begatteten und gefütterten Weibchen; H_6 und H_7 jedoch verändern sich dabei nicht und kommen nur in ganz geringen Mengen vor.

Damit ist die Annahme gerechtfertigt, daß es sich bei H_6 und H_7 um «female proteins» handelt, die bei Weibchen in hohen Konzentrationen während der Vitellogenese auftreten.

Die Bande H_8 ist nicht geschlechtsspezifisch und tritt während der Verdauung in größeren Mengen auf. Ihre Konzentration scheint in den ersten 10–20 Tagen nach der Fütterung von der Kopulation unabhängig zu sein (Abb. 24). Vielleicht handelt es sich um ein «Nährprotein», das in Beziehung zur Ernährung der Gewebe steht. Solche Proteine treten möglicherweise bei Insekten auf (CHEN & LEVENBOOK, 1966).

Eiproteine

Die wasserlöslichen Proteine von Eiern der Vitellogenesephase lassen sich mit der verwendeten Methode in 18 Banden auftrennen (Abb. 23).

Die Banden E_1–E_3 und E_5 sind nur in geringen Konzentrationen vorhanden. E_3 und E_5 sind phospholipidhaltige Glyko-lipoproteine. E_4 ist etwas stärker vorhanden und ist durch den Gehalt an alkalischem

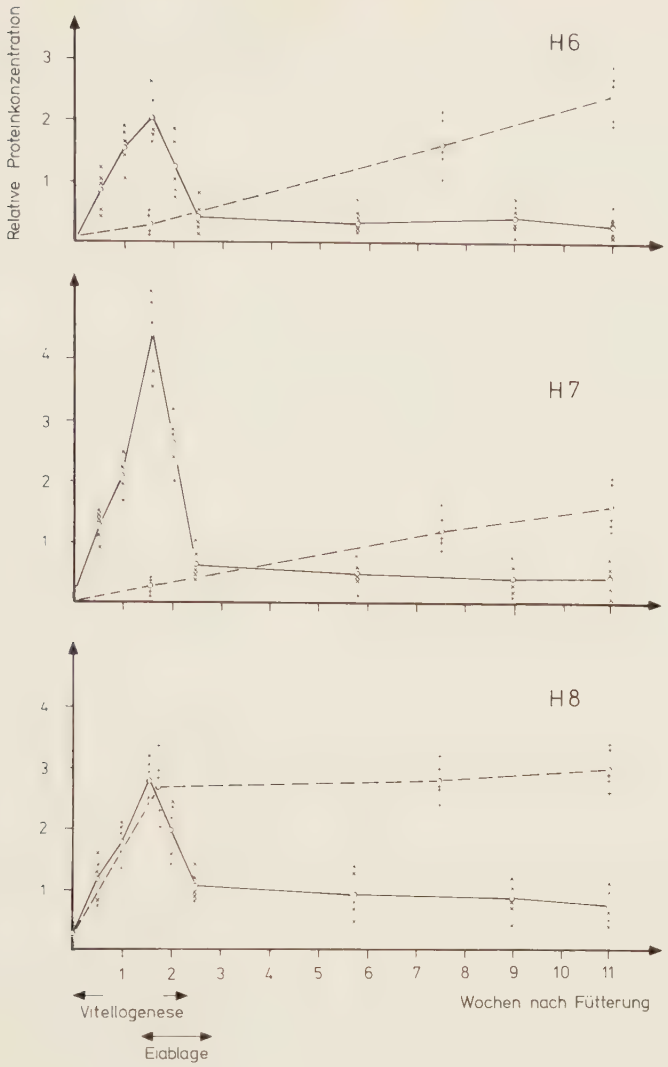


Abb. 24. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Proteinkonzentrationen von H_6, H_7 und H_8 nach der Fütterung bei begatteten ♀♀ (——) und bei unbegatteten ♀♀ (– – –). o: arithmetisches Mittel der Einzelwerte.

Hämatin braun gefärbt. Es handelt sich dabei nach den Farbreaktionen um ein Phospholipide enthaltendes Hämo-glyko-lipoprotein.

Die Bande E_6 ist weitaus am stärksten vorhanden. Beim frisch ovulierten Ei entfallen ca. 90–95% der Eiproteine auf diese Fraktion. Sie stellt daher mit großer Wahrscheinlichkeit die Hauptmenge der Reservesubstanz der Dotterkugeln dar. Diese Annahme wird gestützt

durch das färberische Verhalten. Hämatin, Phospholipide, Cholesterin und Kohlenhydrate sind an dieses Protein gebunden (Hämo-glyko-lipoprotein). Diese Ergebnisse stimmen mit Ausnahme der nicht nachgewiesenen Triglyceride und Cholesterinester mit denjenigen der Histochemie der Dotterkugeln überein.

Die Bande E_7 zeigt die gleichen Farbreaktionen wie das soeben beschriebene E_6 (Hämo-glyko-lipoprotein).

Die Banden E_8 und E_9 sind nur in kleinen Konzentrationen vorhanden. E_8 ist ein phospholipidhaltiges Glyko-lipoprotein, E_9 ein Glykoprotein.

Die Proteinbanden E_{10}–E_{16} sind nur sehr schwach vertreten. E_{17} und E_{18} erscheinen in etwas größeren Konzentrationen. Die Rf-Werte der Frontproteine E_{18} und H_{24} sind etwa gleich groß.

Das von WIGGLESWORTH (1943) im Ei festgestellte alkalische Hämatin ist an die Proteine E_4, E_6 und E_7 gebunden. Dieses ist für die Braunfärbung des Dotters verantwortlich. Der aus dem Wirtsblut stammende Farbstoff scheint ein nutzloser Bestandteil zu sein; er wird während der Verdauung des Dotters in Granulaform in den Darmzellen abgelagert. Die Möglichkeit ist allerdings nicht auszuschließen, daß ein kleiner Teil in porphyrinhaltige Verbindungen der embryonalen und larvalen Gewebe eingebaut wird oder als Eisenreserve dient.

Die Eibanden E_6 resp. E_7 besitzen den gleichen elektrophoretischen Wanderungswert und auch das gleiche färberische Verhalten wie H_6 resp. H_7 der Hämolymphe. Bei Mischungen von Hämolymphe mit Eiextrakt lassen sich die Banden auch bei längeren Laufzeiten nicht voneinander trennen. Die Annahme ist deshalb naheliegend, daß H_6 und E_6 resp. H_7 und E_7 identisch sein können, d. h. daß die «female proteins» H_6 und H_7, vermutlich durch Mikropinocytose (AESCHLIMANN & HECKER, 1967, 1969), in das Ei aufgenommen und als Dotter (E_6, E_7) eingelagert werden. Durch die extraovarielle Lage der Oocyte wird diese Aufnahme begünstigt, da keine Follikelzellen vorhanden sind, welche die Passage der Hämolymphenproteine erschweren. Die Basallamina stellt kein Hindernis für höhermolekulare Stoffe dar (LEES & BEAMENT, 1948; Trypanblauversuch).

Immunologische Reaktionen

Die Hypothese der Aufnahme von «female proteins» in das Ei wurde unter Anwendung immunologischer Reaktionen überprüft, da die Übereinstimmung der Rf-Werte und des färberischen Verhaltens von H_6 und E_6 resp. H_7 und E_7 erst Anhaltspunkte für deren Identität sind.

In einer weißen Maus wurden Antikörper gegen Eiextrakt erzeugt (siehe Kapitel II). Die Hauptmenge der gebildeten Antikörper wird gegen die Eiproteine E_6 und E_7 gerichtet sein, da diese weitaus am

stärksten im Ei konzentriert sind. Bei Anwendung der indirekten Immunofluoreszenzmethode nach COONS auf Kryostatschnitte von sich entwickelnden Eiern zeigen die Dotterkugeln und die Mikrovilliregion eine starke Fluoreszenz.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Hämolymphe von Weibchen aus der Vitellogenesephase wurden die Elektrophoresezylinder der Länge nach auf dem Kryostat geschnitten. Nach der Anwendung der indirekten Immunofluoreszenzmethode nach COONS auf diese Schnitte reagieren H_6 und H_7 positiv mit den Mäuseantikörpern gegen Eiextrakt. Es wird deshalb angenommen, daß H_6 und E_6 resp. H_7 und E_7 antigenisch identisch oder nahe verwandt sind. Die Möglichkeit einer unspezifischen Kreuzreaktion zwischen anderen Eiproteinen als E_6 und E_7 und den Hämolymphenproteinen H_6 und H_7 kann dabei allerdings nicht ganz ausgeschlossen werden; sie dürfte aber sehr klein sein, da diese Eiproteine im Vergleich zu E_6 und E_7 nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommen.

Nach den elektrophoretischen und immunologischen Resultaten scheinen H_6 und E_6 resp. H_7 und E_7 mit großer Wahrscheinlichkeit identisch zu sein. Damit wird die Hypothese der Aufnahme von Hämolymphenproteinen in das Ei resp. die Hypothese der exogenen Dotterquelle weiter gestützt.

3.2.4.5. Bildung der Eischale

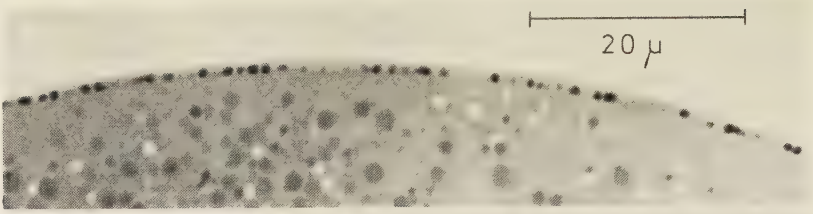
Die Eischale wird bei *O. moubata* von der Eizelle selber gebildet (AESCHLIMANN, 1958; AESCHLIMANN & HECKER, 1967, 1969; LEES & BEAMENT, 1948; WAGNER-JEVSEENKO, 1958) und wird deshalb nicht Chorion genannt.

Mit dem Erscheinen der ersten lichtmikroskopisch sichtbaren Dotterkugeln treten im Bereich des Mikrovillisaums unter der Basallamina vereinzelt Granula (Abb. 25 a) auf, die oft eine in radialer Richtung längsgestreckte Form besitzen (Abb. 25 b). Im Verlaufe der Vitellogenese verbinden sie sich untereinander durch Anlagerung von Schalenmaterial zu einem immer dichter werdenden «Netzwerk» (Abb. 25 b und c). Erst kurz vor der Ovulation erscheint die 2–4 μ dicke Eischale homogen aufgebaut.

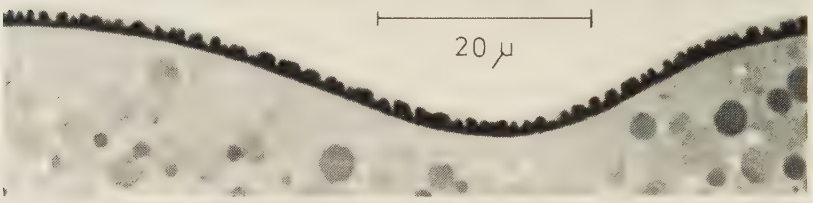
AESCHLIMANN & HECKER (1967, 1969) zeigten, daß das Schalenmaterial wahrscheinlich in Bläschen an die Eiperipherie transportiert wird. Der Bläscheninhalt gelangt in den Raum zwischen die Mikrovilli und polymerisiert dort zur Eischale. Wahrscheinlich sind ER und Dictyosomen an der Synthese des Schalenmaterials beteiligt.

Histochemisch können weder Lipide noch Kohlenhydrate in der Eischale nachgewiesen werden (Tabelle 3). Die Proteinreaktionen fallen jedoch immer stark positiv aus. SH- und SS-Gruppen sind vorhanden.

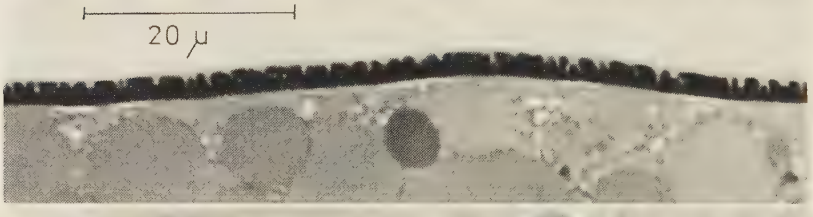
Auf Grund der Methylenblauextinktion bei etwa pH 1,8 und der



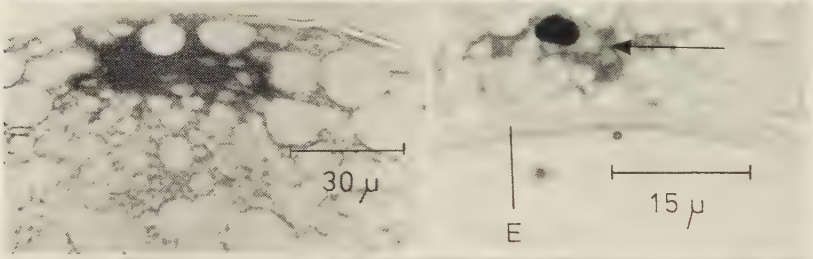
25a



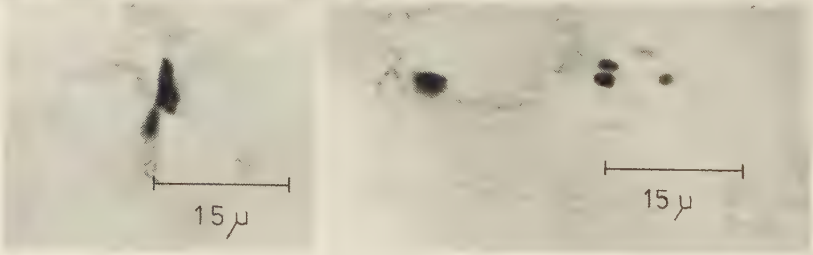
25b



25c



26 27



28 29

Abb. 25 a, b, c. Drei Stadien in der Ausbildung der Eischale. Bei a erscheinen die ersten Granula unter der Basalmembran. Durch Anfügen von weiterem Schalenmaterial ergibt sich ein immer dichter und breiter werdendes «Netzwerk» (b, c). Semidünnschnitte: L. Jenni.

Abb. 26. Symbiontenansammlung. Die Symbionten befinden sich unter der Eiperipherie im Peri- und Retikuloplasma. Fix.: Carnoy; Färb.: Chromalaun-Gallocyanin.

positiven Alcian Blue-Reaktion bei pH 2,5 wurden saure Mucopolysaccharide vermutet. Die positive Alcian Blue CEC-Reaktion bei 1,0 m $MgCl_2$ wies sogar auf stark sulfatierte Mucopolysaccharide hin. Anderseits sprach der negative Ausfall der Alcian Blue-Reaktion bei pH 1,0 und der Sulfatgruppennachweise gegen diese Vermutungen. Auch konnten weder mit der HID- und LID-Reaktion noch mit der dialysed iron-Methode saure Mucopolysaccharide nachgewiesen werden. Der Grund dieser widersprüchlichen Resultate dürften die offenbar sehr sauren Proteine der Eischale sein. Führt man eine milde Methylierung der COOH-Gruppen durch, so bleibt die Alcian Blue-Färbung bei pH 2,5 aus. Eine anschließende Hydrolyse stellt die Färbbarkeit wieder her. Für die Alcian Blue-Reaktion bei pH 2,5 dürfte damit der hohe Gehalt an COOH-Gruppen in den sauren Schalenproteinen verantwortlich sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß nach den histochemischen Resultaten die Eischale aus sauren Proteinen aufgebaut ist. Mucopolysaccharide, Lipide und Kohlenhydrate sind nicht nachweisbar. Damit werden die Resultate von Lees & Beament (1948) bestätigt, die in ihren chemischen Untersuchungen ebenfalls nur Proteine in der Eihülle von *O. moubata* vorfanden.

3.2.4.6. Reticulo- und Periplasma

Im ovulationsbereiten Ei erfüllt das eigentliche Cytoplasma den Raum zwischen den paraplasmatischen Einschlüssen (Dotterkugeln, Lipidvakuolen und Glykogengranula) als lichtoptisch kaum sichtbares Reticulo- und Periplasma. Die in der jungen Oocyte kräftige Basophilie ist nur noch schwach vorhanden. Sie geht durch Ribonucleasebehandlung verloren und wird daher auf die RNS vermutlich der Ribosomen zurückgeführt.

Es ist bekannt, daß der Eicortex Sitz wichtiger morphogenetischer Faktoren ist. Sowohl Polarität und Symmetrie des Eies wie auch die Hauptachsen des Embryos sind teilweise an ihn gebunden (Kuehn, 1965; Raven, 1961). Lichtmikroskopisch zeigt der Cortex des untersuchten Eies jedoch keine feststellbaren Differenzierungen.

«Cortical granules», die an Befruchtungsreaktionen wie z. B. der Bildung der Befruchtungsmembran teilnehmen können (Raven, 1961), wurden keine beobachtet.

Abb. 27. Ovulierte Oocyte I aus dem Ovarlumen. Im Kernraum (→) liegt ein basophiler Nucleolusrest. E = Eischale. Fix.: Carnoy; Färb.: Chromalaun-Gallocyanin.

Abb. 28 und 29. Eier aus dem distalen Abschnitt des Ovidukts (28) und dem Uterus (29). Die Abbildungen zeigen stark basophile Gebilde, die als Chromosomen gedeutet werden. Fix.: Carnoy; Färb.: Chromalaun-Gallocyanin.

3.2.4.7. Symbionten

Die Symbionten sammeln sich im Verlaufe der Vitellogenese in der dem Kern resp. dem Funiculus entgegengesetzten Eiregion an und konzentrieren sich dort auf einen kleinen Raum im Cytoplasma zwischen den Dotterschollen (Abb. 18 und 26).

Die Gründe für die Ansammlung und für diese bevorzugte Stelle sind unbekannt. Es ist auch nicht geklärt, ob die Symbionten durch Eigenbewegung oder durch feine Plasmaströmungen an den Ort gelangen.

Durch die «Infektion» des Eies werden die Symbionten an die nächste Generation weitergegeben (transovarielle Übertragung). Sie spielen vermutlich eine wichtige Rolle als Vitaminlieferanten (siehe Buchner, 1965).

3.3. Funiculus

Am Ende der Prävitellogenese scheint der Funiculus fertig ausgebildet zu sein. Während der Vitellogenese werden keine Mitosen mehr beobachtet. Der lange, schmale Funiculus verleiht, zusammen mit der Basallamina, der dotterbildenden Oocyte eine rotationsellipsoidähnliche Form.

Kern

Im Verlauf der Vitellogenese nehmen die Kerne der Funiculuszellen an Volumen zu. Zu Beginn weisen sie einen Durchmesser von etwa 4,5–5 μ, gegen Schluß einen solchen von etwa 6–6,5 μ auf. Gleichzeitig werden sie stärker euchromatisch. Der Hauptnucleolus nimmt ebenfalls an Größe zu.

Diese Kernveränderungen deuten auf eine Belastung des Zellstoffwechsels hin.

Cytoplasma

Die Zellgröße nimmt während der Vitellogenese etwas zu. Die recht ausgeprägte, Ribonuclease-labile Basophilie ist auf den Gehalt an RNS zurückzuführen.

Im Cytoplasma entstehen Lipidvakuolen, die histochemisch Triglyceride und Phospholipide zu enthalten scheinen. Ebenfalls können geringe Mengen an Glykogen nachgewiesen werden.

Die Kern- und Cytoplasmaveränderungen während der Vitellogenese deuten darauf hin, daß es sich bei der Funiculuszelle keineswegs nur um eine passive Verbindungszelle zwischen Ei und Ovar handelt. Sie ist auch «synthetisch» tätig. Ob Substanzen aus der Funiculuszelle in das Ei gelangen und welche Bedeutung ihnen zukommt, kann mit den angewandten lichtmikroskopischen Methoden nicht entschieden werden. Aeschlimann & Hecker (1967) beschrieben Bläschen mit elektronendichtem Inhalt, die möglicherweise aus den Funiculuszellen

in die Oocyte gelangen. Volumenmäßig dürfte jedoch dieser Vorgang kaum viel zur Dotterbildung beitragen.

Vielleicht sind die Funiculuszellen in einer noch unbekannten Art und Weise auch am Aufbau der Eipolarität beteiligt, die sich in der Achse Eikern–Symbiontenansammlung (Abb. 9 und 18) und später in der Embryonalentwicklung äußert (siehe Kapitel Eipolarität und Hauptachsen des Embryos).

Rückblick auf die Vitellogenese

In dieser Phase ist die wachsende Oocyte in erster Linie mit dem Aufbau der Eischale und des chemisch offenbar sehr komplexen Dotters beschäftigt. Im Zusammenhang mit der dadurch bedingten außerordentlichen Belastung des Zellstoffwechsels vergrößern sich Kern und Nucleolus um ein Vielfaches. Der in der Prophase der ersten Reifeteilung verharrende Kern ist gänzlich euchromatisch (Arbeitskern!). Erst kurz vor dem Ende der Vitellogenese lösen sich Nucleolus und Kernmembran auf; der Kerninhalt bleibt im Cytoplasma liegen.

Die Aufnahme von Trypanblau in das Ei sowie die elektrophoretischen und immunologischen Untersuchungen unterstützen die Hypothese der exogenen Dotterquelle. Zwei spezifisch weibliche, während der Vitellogenese verstärkt auftretende Hämolymphenproteine («female proteins») scheinen in die Oocyte aufgenommen und in die Dotterkugeln eingelagert zu werden; vermutlich geschieht dies durch Mikropinocytose (Aeschlimann & Hecker, 1967, 1969).

Das rotationsellipsoidförmige Ei erhält durch die Anheftung am Ovar mittels des Funiculus eine Polarisierung. Der Kern befindet sich an der Eiperipherie beim Funiculus. Die Symbionten sammeln sich am diametral entgegengesetzten Eipol an.

4. Ovulation und postovulatorische Phase

Die postovulatorische Phase dauert von der Ovulation bis zur Eiablage. Das ins Ovarlumen ovulierte Ei gelangt durch einen der paarigen Ovidukte in den Uterus und wird dann durch die Vagina nach außen abgegeben.

4.1. Ovulationsprozeß

Am Ende der Vitellogenese gelangt das außen am Ovar befestigte Ei in das Ovarlumen. Der eigentliche Ovulationsprozeß ist nie beobachtet worden; er spielt sich offenbar sehr rasch ab. Auf histologischen

Schnitten findet man entweder reife, noch außen am Ovar befestigte Eier oder dann bereits ovulierte Eier im Ovarlumen; Zwischenstadien werden nie gesehen.

An der Ovulationsstelle bleibt die verkürzte, stark gefältelte und eingebuchtete Basalmembran zurück. Die Funiculuszellen differenzieren sich wahrscheinlich zu Ovarepithelzellen um, da nie zugrundegehende Zellen beobachtet werden.

Die auslösenden Faktoren der Ovulation können nur hypothetisch diskutiert werden. Sicher spielt dabei die von Lees & Beament (1948) und Wagner-Jevseenko (1958) erwähnte starke Dehnung der Basalmembran durch die Eivergrößerung und der daraus resultierende Druck auf das Ei eine Rolle. Es ist aber auch denkbar, daß am Schluß der Vitellogenese der Zusammenhalt zwischen den Funiculuszellen und zwischen der Basallamina und dem Ei aufgehoben wird (z. B. durch Auflösung von interzellulären Kittsubstanzen) und auf diese Weise die Passage des Eies in das Ovarlumen erleichtert wird.

Erwähnenswert ist, daß die nach der Ovulation übrig bleibende, stark gefältelte Basalmembran auf der Innenseite eine Oil Red O-positive Lipidschicht besitzt (vermutlich neutrale Lipide). Da eine solche Lipidlage während der Vitellogenese nie zwischen Basalmembran und Eihülle gefunden wird, ist es denkbar, daß kurz vor Ovulation diese Lipide entweder von der Eizelle oder von den Funiculuszellen in den Zwischenraum abgegeben werden. Sowohl Oocyte wie Funiculuszellen enthalten Oil Red O-positive Lipide. Diese Lipidzwischenschicht könnte in einer Art «Schmiereffekt» die Gleitfähigkeit des Eies gegenüber der Basalmembran erhöhen und so das Herausgleiten der Oocyte durch die Ovarwand in das Ovarlumen begünstigen.

Die frisch ovulierten Oocyten sammeln sich im Ovarlumen an (bis zu 50 Stück). Die außen an der Ovarwand befestigten, lose verteilten Muskelzellen (vgl. Abb. 9) helfen vermutlich durch Kontraktion mit, die Eier in die Ovidukte zu befördern. Die Passage des proximalen Ovidukts und der Ampulle geschieht offenbar schnell, da selten Eier in diesem Abschnitt gefunden werden. Am Ende des distalen Ovidukts und im Uterus sammeln sich die Eier bis zu ihrer Ablage wieder an (bis zu 26 Stück).

4.2. Cytologie der Eizelle

4.2.1. Kern

Wie im Kapitel der Vitellogenese bereits beschrieben wurde, schrumpft der stark angeschwollene Kern kurz vor der Ovulation unter Auflösung der Kernmembran. Der Nucleolus verkleinert sich ebenfalls und fragmentiert. Das leicht basophile, feulgennegative Kernmaterial vermischt sich mit dem Cytoplasma, bleibt aber am Ort liegen. Dies gilt

auch für das frisch ovulierte Ei. Sehr oft liegen in der Kernregion noch kleine, manchmal noch vakuolisierte Nucleolusreste (Abb. 27). Immer liegt das Kerngebiet, nach Rekonstruktion der Serienschnitte, diametral der Symbiontenansammlung gegenüber. Die sichtbare Polarisierung des Eies (Achse: Kern–Symbionten) wird also beibehalten.

In Eiern aus dem distalen Ovidukt und dem Uterus können in der Kernregion unter der Eiperipherie stark basophile Chromosomen gesehen werden. Sie besitzen längliche bis rundliche Formen; z. T. erscheinen sie auch zusammengeballt (Abb. 28 und 29). Eine Zuordnung der Chromosomen zu Meiose- oder Befruchtungsvorgängen ist zur Zeit noch nicht möglich. Spindelfiguren wurden bis jetzt nicht beobachtet.

Vermutlich spielt sich die Befruchtung in der Ampulle ab (Wagner-Jevseenko, 1958). Da Spermiophoren in den Ampullenzellen phagozytiert werden, vermutet die Autorin eine Diffusion der dadurch freigesetzten männlichen Erbsubstanzen in die Eizelle beim Passieren der Ampulle.

Im Gegensatz zu Wagner-Jevseenko (1958) vermute ich eher eine klassische Befruchtung. Sie geschieht wahrscheinlich in den oberen Geschlechtswegen (Ampulle?) durch reife Spermiophoren, die vermutlich auf enzymatischem Weg die in dieser Phase noch weiche Proteinschale des Eies durchdringen und dann den männlichen Kern in das Ei entlassen.

Die Hypothese einer klassischen Befruchtung bei Argasiden durch ein eindringendes Spermium scheint durch Arbeiten von Goroshchenko (1960, 1964; zitiert in Balashov, 1964) bestätigt zu werden[1]. Bei Ixodiden sind drei Fälle in der Literatur bekannt. Samson (1909) beschrieb bei *Ixodes ricinus* das Eindringen eines Spermiophors in das Ei. Bei der gleichen Art beschrieb Wagner (1892) die Meiose und die Vereinigung von weiblichem und männlichem Kern im abgelegten Ei. Nach Yalvac (1939) und Dennis (1932) findet bei *Hyalomma* spec. resp. bei *Boophilus annulatus* die Befruchtung im Ovidukt statt.

Wenige Stunden nach der Ablage befindet sich der Kern im Eizentrum. Er beginnt anschließend die Furchungsteilungen (Aeschlimann, 1958).

4.2.2. Cytoplasma und Paraplasma

Während der postovulatorischen Phase können mit den angewandten cytologischen, histochemischen und elektrophoretischen Methoden keine Veränderungen im Cytoplasma und im Dotter gefunden werden.

---

[1] Die englische Übersetzung der Arbeit von Balashov (1964), in der Resultate von Goroshchenko (1960; 1964) zur Befruchtung bei Argasiden aufgeführt werden, gelangte erst bei der Niederschrift des Manuskripts in meine Hände. Im Moment stehen mir deshalb die Originalarbeiten von Goroshchenko nicht zur Verfügung.

Das im Ovarlumen liegende Ei behält die während der Oocytenreifung ausgebildete Rotationsellipsoidform bei (kürzester Durchmesser: 760–930 μ; längster Durchmesser: 880–1020 μ). Nach Passage der Ampulle – im distalen Ovidukt – beginnen sich die Eier zu vergrößern. Je näher das Ei bei der Einmündung in den Uterus liegt, desto größer ist es. Im Uterus erreicht es seine maximale Größe unter Beibehaltung der Rotationsellipsoidform (kürzester Durchmesser: 910–960 μ; längster Durchmesser: 990–1100 μ). Die dadurch erfolgte Volumenzunahme beträgt zwischen 60–89%. Der Vorgang kann durch die Bestimmung des Trockengewichts und des Wassergehalts auf eine Wasseraufnahme zurückgeführt werden. Damit werden die Feststellungen von Lees & Beament (1948) bestätigt und ergänzt.

Unklar bleiben die auslösenden Faktoren dieser Wasseraufnahme. Da die Volumenzunahme im distalen Ovidukt, nach der Passage der Ampulle, beginnt, kommen möglicherweise die Befruchtungsvorgänge dafür in Betracht.

4.2.3. Symbionten

Während der postovulatorischen Phase bleiben die Symbionten weiterhin an der Eiperipherie versammelt. Erst wenige Stunden nach der Ablage beginnen sie sich im Ei zu verteilen, um dann später verschiedene Zeckenorgane zu befallen.

4.2.4. Eischale

Frisch ovulierte Eier aus dem Ovarlumen besitzen eine sehr weiche und plastische Eischale. Uteruseier dagegen weisen eine härtere, viel weniger elastische Eihülle auf. Es ist ungeklärt, wie dieser Härtungsprozeß der Schalenproteine zustande kommt. Mit den angewandten histochemischen Methoden können keine Unterschiede zwischen Eischalen von Ovarlumen- resp. Uteruseiern festgestellt werden.

Ähnliche Härtungen (engl. «tanning») von Proteinstrukturen spielen sich in der Cuticula und in Ootheken von Insekten ab, wobei die Proteine untereinander mit Quinonen vernetzt werden (Wigglesworth, 1965). Möglicherweise laufen ähnliche Vorgänge an den Proteinen der Eischale von *O. moubata* ab.

Da die Härtung der Eischale erst nach der Ampullenpassage während der Wasseraufnahme beginnt, wird der Prozeß vielleicht durch die Befruchtungsvorgänge ausgelöst. Möglicherweise spielen dabei aber auch Sekrete der Geschlechtsgänge eine Rolle; besonders die Uteruszellen scheinen eine starke Sekretion mit noch unbekannter Funktion zu besitzen.

Die Stelle des Funiculusansatzes am Ei wird durch eine lange, feine Rinne in der Eischale angezeigt (Abb. 30). Zwischen Funiculuszellen und Oocyte werden offenbar etwas weniger Schalensubstanzen abge-

Abb. 30. Ovuliertes Ei aus dem Ovarlumen. Bei schräg auffallendem Licht ist die «Rinne» (Funiculusansatzstelle) in der Eischale erkennbar.

lagert, so daß an diesen Stellen die Eischale etwas dünner ausgebildet ist. Dadurch entsteht die Rinne als negativer Abdruck des Funiculus. Eine analoge Bildung findet sich als «Mikropyle» auch bei Echinodermeneiern (RAVEN, 1961).

Es ist zur Zeit unbekannt, ob diese Rinne eine funktionelle Bedeutung besitzt, z. B. im Sinne einer Mikropyle. Da die Eihülle an dieser Stelle verdünnt ist, wäre bei einer Befruchtung das Eindringen der Spermiophoren erleichtert. Es sei daran erinnert, daß bei Insekten sowohl Durchbohrungen wie auch verdünnte Stellen im Chorion als Mikropylen funktionieren können (WEBER, 1966).

Nach der Ablage wird das Ei durch das Géné'sche Organ mit einer Lipoidschicht umgeben, durch die es vor einer Austrocknung geschützt wird (LEES & BEAMENT, 1948).

D. Eipolarität und Hauptachsen des Embryos

Wie bereits im Kapitel der Vitellogenese erwähnt, besitzt das Ei von *O. moubata* einen polaren Aufbau. Funiculus, Kern und Symbiontenansammlung liegen auf einer kleinen Achse der rotationsellipsoidförmigen Oocyte (Abb. 9, 18 und 31). Der Dotter zeigt keine solche polare Anordnung; er ist gleichmäßig im Ei verteilt. Diese sichtbare Eipolarität steht offensichtlich in Beziehung zur Lage des Eies im Ovar, wie dies bei vielen tierischen Oocyten der Fall ist (z. B. KUEHN, 1965; RAVEN, 1961). Der Kern liegt unmittelbar beim Funiculus, die Symbiontenansammlung befindet sich diametral gegenüber. Möglicherweise spielt der Funiculus bei der Ausbildung dieser Polarität eine wichtige Rolle.

In der Embryogenese entwickelt sich die Primitivplatte («disque germinatif primordial» nach AESCHLIMANN [1958]) auf der dem Funi-

culus resp. der Rinne abgewandten Seite in der Nähe der früheren, mittlerweile aufgelösten Symbiontenansammlung (Abb. 31 a und b). Mit der Auswachsung des Keimstreifs versetzt sie sich seitlich. Der Kopflappen kommt bis in die Region der Rinne zu liegen (Abb. 31 c und d). Es erfolgt dann eine starke Verkürzung des Keimstreifs (Abb. 31 e). Diese Position wird bis zum Ende der Embryonalentwicklung etwa beibehalten (Abb. 31 f).

Aus dieser Darstellung geht hervor, daß die Region der Symbiontenansammlung im Ei zur ventralen Seite des Embryos wird; die Region der Rinne bzw. des Eikerns wird zur dorsalen Seite. Damit entspricht die sichtbare Eipolaritätsachse etwa der dorso-ventralen Achse des Embryos.

Die cephalo-caudale Achse des Embryos fällt etwa mit der großen Achse des rotationsellipsoidartigen Eies zusammen. Die Bilateralsymmetrieebene entspricht damit etwa der Ebene, die im Ei durch Funiculusband, Eikern und Symbiontenansammlung bestimmt wird.

Die Dorsoventralität und Bilateralsymmetrie des Embryos stehen somit offenbar in einem engen Zusammenhang mit der Polarität der

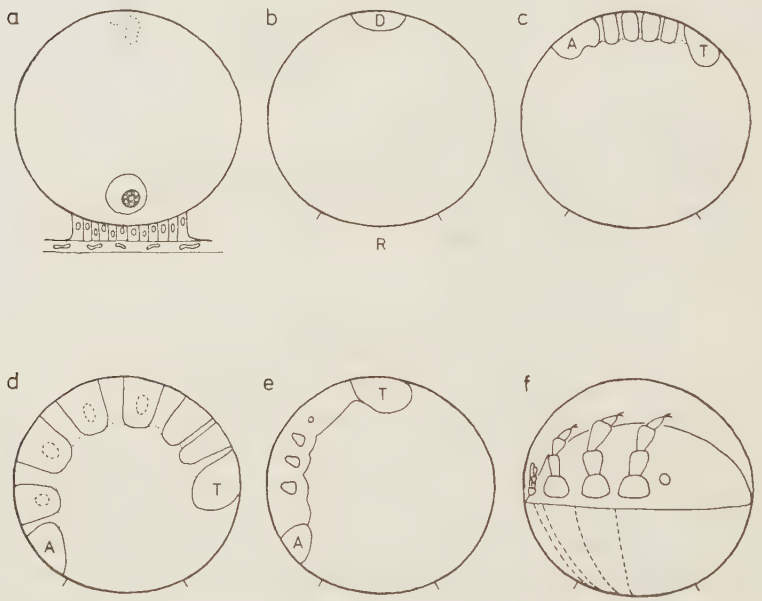


Abb. 31. Schematische Darstellung der Eipolarität und der Ausbildung der Hauptachsen des Embryos. a) Eipolarität, ausgedrückt durch den beim Funiculus liegenden Eikern und die diametral gegenüberliegende Symbiontenansammlung. b) Ausbildung der «disque germinatif primordial» (D). R = Rinne in der Eischale (Stelle des Funiculusansatzes). c) d) Ausbildung des Keimstreifs. A = Acron; T = Telson. e) Verkürzung des Keimstreifs. f) Lage des schlüpfbereiten Embryos im Ei.

Eizelle, wie das auch von andern Tieren bekannt ist (KUEHN, 1965; NETZEL, 1968; RAVEN, 1961). Welche Faktoren für die Bestimmung der Eipolarität und der Embryo-Hauptachsen bei *O. moubata* verantwortlich sind und wo sie sich lokalisieren, sind offene Fragen. Bei gewissen näher untersuchten Oocyten befinden sie sich wahrscheinlich im Eicortex (Periplasma und Oocytenmembran). Sie werden vermutlich schon früh in der Oogenese angelegt (KUEHN, 1965; NETZEL, 1968; RAVEN, 1961).

IV. Diskussion

Die von AESCHLIMANN & HECKER (1967, 1969) aufgestellte Hypothese der exogenen Dotterquelle wird durch die vorliegenden Resultate unterstützt. Zwei «female proteins» werden in die Eizelle aufgenommen und in den Dotterkugeln gespeichert. Durch diese Aufnahme von bereits synthetisierten Makromolekülen wird wahrscheinlich eine große Entlastung des Oocytenstoffwechsels erreicht. Da die Synthesekapazität der Eizelle offenbar beschränkt ist, stellt vermutlich die exogene Dotterquelle die Voraussetzung für die Bildung großer, dotterreicher Eier dar.

Der Anteil der exogenen resp. der endogenen Dotterquelle am Aufbau der Dotterkugeln kann mit den angewandten Methoden nicht bestimmt werden. Es wird jedoch vermutet, daß die extraoocytär gebildeten «vitellogenins» den Hauptanteil der Dotterproteine ausmachen. Der Syntheseapparat der Eizelle dient wohl in erster Linie der Herstellung der Eischalenproteine, der Membranen, der benötigten Enzyme etc. Die Anwendung von autoradiographischen und morphometrischen Methoden kann möglicherweise zur Abklärung dieser zellphysiologisch interessanten Fragen beitragen (JENNI, in Vorbereitung).

Die Synthese der Hämolymphenproteine bei Insekten geschieht im Darmepithel (ROTH & PORTER, 1964) oder im Fettkörper (BODNARYK & MORRISON, 1968; ENGELMANN, 1969; PAN, BELL & TELFER, 1969) oder auch in beiden zusammen (MILLS, GREENSLADE & COUCH, 1966). Bei *O. moubata* ist der Syntheseort nicht bekannt; möglicherweise sind es die Darmzellen. Diese Vermutung findet eine gewisse Stütze in den Beobachtungen, daß bei unbegatteten Weibchen – im Gegensatz zu begatteten – die Verdauung der Blutmahlzeit nur sehr langsam vor sich geht und die «female proteins» entsprechend nur sehr langsam an Konzentration zunehmen. Ein Fettkörper ist nicht vorhanden.

Es ist auffallend, daß nur die «female proteins» H_6 und H_7 in nachweisbaren Mengen in das Ei aufgenommen werden. Der Mechanismus dieser selektiven Aufnahme ist unbekannt. Möglicherweise spielen dabei die «coated vesicles» der Pinocytose eine Rolle (FAWCETT, 1966; ROTH & PORTER, 1964; SMITH, 1968; TELFER, 1965).

Eine wichtige Funktion der Hämolymphenproteine H_6–H_8 und H_{12}–H_{15} könnte der Transport von Lipiden in der Hämolymphe sein. Ein solcher Lipidtransport durch Proteine vollzieht sich in der Hämolymphe von Insekten (CHINO & GILBERT, 1965; CHINO, SATURO & KEIJI, 1969; SIAKATOS, 1960; THOMAS & GILBERT, 1967; THOMAS & LAWRENCE, 1968; WANG & PATTON, 1969; WLODAWER & LAGWINSKA, 1967) und im Blut von Wirbeltieren (z. B. CANTAROW & SCHEPARTZ, 1967). Die in der vorliegenden Arbeit angewandten Nachweismethoden lassen keine genaueren qualitativen Aussagen über die gebundenen Lipide zu. Vermutlich werden neben den nachgewiesenen Phospholipiden und dem Cholesterin noch weitere Lipide oder lipophile Substanzen transportiert (z. B. Triglyceride, Cholesterinester, Steroidhormone?).

Es ist bekannt, daß bei Insekten die Kontrolle der Vitellogenese hormonal über die Corpora allata und/oder die neurosekretorischen Zellen der pars intercerebralis geschieht (ENGELMANN, 1969; HILL, 1962, 1965; MILLS, GREENSLADE & COUCH, 1966; SCHEURER, 1969; TELFER, 1965; WIGGLESWORTH, 1964; WILKENS, 1968; WILLIAMS, 1965).

Auch bei der Zecke *O. moubata* scheint eine hormonale Steuerung durch das Gehirn zu erfolgen (AESCHLIMANN, 1968). Das endokrine System wird vermutlich schon allein durch die Blutmahlzeit aktiviert. Es kommt zu einem langsamen Anstieg der «female protein»-Konzentration und zu einer über längere Zeit dauernden, meist unvollständigen Vitellogenese. Das endokrine System wird aber offensichtlich viel stärker stimuliert, wenn zusätzlich zur Blutmahlzeit noch männliche Substanzen bei der Kopula ins Weibchen eingeführt werden. Der «female protein»-Titer steigt jetzt sehr rasch an; die Vitellogenese erfolgt ebenfalls entsprechend schnell. Auch bei Insekten scheinen während der Begattung männliche Substanzen in das Weibchen eingeführt zu werden, die vermutlich über endokrine Systeme vitellogenesebeschleunigend wirken (MERLE, 1968).

Die chemische Natur dieser noch unbekannten männlichen Substanzen und ihre Wirkung auf das Zeckengehirn sowie der Einfluß des Hormonsystems auf die Synthese der «vitellogenins» und auf die Oocyte bei *O. moubata* müssen in weiteren Arbeiten genauer untersucht werden. Bei der Zecke *O. tholozani* soll DOPA (in der Samenflüssigkeit) mindestens teilweise für die Eireifung verantwortlich sein (GALUN & WARBURG, 1967).

In den bisher bei Insekten untersuchten Fällen erscheint das Glykogen erst spät in der Oogenese als letzter der Reservestoffe nach dem Absinken der euplasmatischen Proteinsynthese (ENGELS & DRESCHER, 1964; RAMAMURTY, 1968; RAVEN, 1961). Zellphysiologisch gesehen scheinen intensive Protein- und Glykogensynthese in einem antagonistischen Verhältnis zueinander zu stehen (ENGELS & BIER, 1967). Bei

der Oocyte von *O. moubata* scheint dies nicht zuzutreffen. Hier ist das Glykogen bereits in den Frühstadien der Vitellogenese nachweisbar. Weitere autoradiographische und biochemische Untersuchungen können vielleicht diese gegensätzlichen Befunde erklären.

Das cytologische Bild läßt auf einen äußerst aktiven Eikern schließen. Dies ist verständlich im Blick auf die enorme Belastung des Oocytenstoffwechsels während der Oogenese. Bei gewissen untersuchten Eiern ist der Kern aber nicht nur am aktuellen Stoffwechsel beteiligt; er produziert außerdem stabile, inaktivierte m-RNS und r-RNS. Diese RNS-Sorten werden im Ei gespeichert und sind erst später, bei den ersten Entwicklungsschritten der Embryogenese, wirksam. Sie sind an den beim Beginn der Entwicklungsprozesse einsetzenden Proteinsynthesen beteiligt (Duspiva, 1969; Hansen-Delkeskamp, 1969). Über das Vorhandensein solcher erst bei der Embryogenese wirksam werdenden mütterlichen «messengers» und Ribosomen bei *O. moubata* kann natürlich mit den angewandten Methoden nicht entschieden werden. Wohl werden offensichtlich große Mengen von Ribosomen während der Oogenese gebildet, und es ist eine leichte, Ribonuclease-labile Cytoplasmabasophilie in reifen Eiern vorhanden. Diese entwicklungsphysiologisch interessante Frage wird nur mit dem Einsatz von molekularbiologischen Methoden zu lösen sein.

V. Literaturverzeichnis

Adiyodi, R. G. (1967). The nature of hemolymph proteins in relation to the ovarian cycle in the viviparous cockroach *Nauphoeta cinerea*. – J. Insect Physiol. *13*, 1189–1195.

Aeschlimann, A. (1958). Développement embryonnaire d'*Ornithodorus moubata* (Murray) et transmission transovarienne de *Borrelia duttoni*. – Acta trop. *15*, 15–64.

Aeschlimann, A. (1968). La ponte chez *Ornithodorus moubata* Murray (Ixodoidea, Argasidae). – Rev. suisse Zool. *75*, 1033–1039.

Aeschlimann, A. & Hecker, H. (1967). Observations préliminaires sur l'ultrastructure de l'ovocyte en développement chez *Ornithodorus moubata* Murray (Ixodoidea, Argasidae). – Acta trop. *24*, 225–243.

Aeschlimann, A. & Hecker, H. (1969). Vitellogénèse et formation cuticulaire chez l'œuf d'*Ornithodorus moubata* Murray (Ixodoidea, Argasidae). Etude au microscope électronique. – Acarologia, t. *XI*, 180–192.

Aggarwal, S. K. (1968). Pinocytosis during vitellogenesis in the mealworm, *Tenebrio molitor* L. – Acta ent. bohemoslov. *65*, 272–275.

Anderson, E. (1964). Oocyte differentiation and vitellogenesis in the roach *Periplaneta americana*. – J. Cell Biol. *20*, 131–155.

Anderson, E. (1968). Cortical alveoli formation and vitellogenesis during oocyte differentiation in the pipefish, *Syngnathus fuscus*, and the killifish, *Fundulus heteroclitus*. – J. Morph. *125*, 23–60.

Anderson, E. & Huebner, E. (1968). Development of the oocyte and its accessory cells of the polychaete *Diopatra cuprea* (Bosc.). – J. Morph. *126*, 163–198.

ARNDT, E. A. (1960). Die Aufgaben des Kerns während der Oogenese der Teleostier. – Z. Zellforsch. *51,* 356–378.

BALASHOV, Y. S. (1964). Structure and development of the genital system in ticks of the superfamily Ixodoidea. – Parazit. Sborn. Zool. Inst. Akad. Nauk. SSSR *22,* 28–60.

BEAMS, H. W. & KESSEL, R. G. (1963). Electron microscope studies on developing crayfish oocytes with special reference to the origin of yolk. – J. Cell Biol. *18,* 621–649.

BEAMS, H. W. & KESSEL, R. G. (1969). Synthesis and deposition of oocyte envelopes and the uptake of yolk in the dragonfly (Odonata: Aeschnidae). – J. Cell Sci. *4,* 241–264.

BEAMS, H. W. & SEKHON, S. S. (1966). Electron microscope studies on the oocyte of the fresh water mussel (Anodonta), with special reference to the stalk and mechanism of yolk deposition. – J. Morph. *119,* 477–501.

BERNHARD, W. & GRANBOULAN, N. (1968). The nucleolus in vertebrate cells, in: The nucleus, edited by DALTON, A. J. & HAGUENAU, F., 244 pp. – New York and London: Academic Press.

BIER, K. (1963). Autoradiographische Untersuchungen über die Leistungen des Follikelepithels und der Nährzellen bei der Dotterbildung und Eiweißsynthese im Fliegenovar. – Wilhelm Roux' Arch. Entwickl. – Mech. Org. *154,* 552–575.

BIER, K. (1968). Insect oogenesis with special reference to nuclear structure and function. – Accademia Nazionale dei Lincei Quaderno N. *104,* 61–72.

BIER, K. & RAMAMURTY, P. S. (1964). Elektronenoptische Untersuchungen zur Einlagerung der Dotterproteine in die Oocyte. – Naturwissenschaften *51,* 223–224.

BODNARYK, R. P. & MORRISON, P. E. (1966). The relationship between nutrition, hemolymph proteins and ovarian development in *Musca domestica.* – J. Insect Physiol. *12,* 963–976.

BODNARYK, R. P. & MORRISON, P. E. (1968). Immunochemical analysis of the origin of a sex-specific accumulated blood protein in female houseflies. – J. Insect Physiol. *14,* 1141–1146.

BONHAG, P. F. (1958). Ovarian structure and vitellogenesis in insects. – Ann. Rev. Entomol. *3,* 137–160.

BONNET, A. (1907). Recherches sur l'anatomie comparée et le développement des Ixodidés. – Thèse Lyon.

BREMNER, K. C. (1959). Studies on "haemixodovin", the pigment in the eggs of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). – Aust. J. biol. Sci. *12,* 263–273.

BUCHNER, P. (1965). Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. – New York, London: Interscience Publishers, 909 pp.

BURGDORFER, W. (1951). Analyse des Infektionsverlaufes bei *Ornithodorus moubata* (Murray) und der natürlichen Übertragung von *Sp. duttoni.* – Acta trop. *8,* 193–262.

CANTAROW, A. & SCHEPARTZ, B. (1967). Biochemistry, 898 pp. – Philadelphia & London: W. B. Saunders Company.

CHEN, P. S. & LEVENBOOK, L. (1966). Studies on the haemolymph proteins of the blowfly *Phormia regina.* – J. Insect Physiol. *12,* 1595–1627.

CHINO, H. & GILBERT, L. I. (1965). Lipid release and transport in insects. – Biochim. Biophys. Acta *98,* 94–110.

CHINO, H., SATURO, M. & KEIJI, H. (1969). Diglyceride carrying lipoproteins in insect hemolymph. Isolation, purification and properties. – Biochim. Biophys. Acta *176,* 1–26.

CHRISTOPHERS, S. R. (1906). The anatomy and histology of ticks. – Sci. Mem. med. sanit. Dep. India *23,* 55 pp.

Clarke, J. T. (1964). Simplified "disc" (polyacrylamide gel) electrophoresis. – Ann. N.Y. Acad. Sci. *121,* 428–436.

Coles, G. C. (1964). Some effects of decapitation on metabolism in *Rhodnius prolixus* Stål. – Nature (Lond.) *203,* 323.

Coles, G. C. (1965). The haemolymph and moulting in *Rhodnius prolixus* Stål. – J. Insect Physiol. *11,* 1317–1323.

Das, R. S. (1939). The cytoplasmic inclusions in the oogenesis of *Rhipicephalus sanguineus.* – Z. Zellforsch. *30,* 36–51.

Dennis, E. W. (1932). The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith and Kilbourne) of Texas cattle fever in the tick *Margaropus annulatus* (Say) with notes on the embryology of *Margaropus.* – Univ. Calif. Publ. Zool. *36,* 263–298.

Diehl, P. A. (1969). Hämolymphenproteine und Vitellogenese bei *Ornithodorus moubata,* Murray (Ixodoidea Argasidae). – Bull. Soc. ent. suisse *42,* 117–125.

Douglas, J. R. (1943). The internal anatomy of *Dermacentor andersoni* Stiles. – Univ. Calif. Publ. Zool. *7,* 207–272.

Droller, M. S. & Roth, T. F. (1966). An electron microscope study of yolk formation during oogenesis in *Lebistes reticulatus* Guppyi. – J. Cell Biol. *28,* 209–232.

Dumont, J. N. & Anderson, E. (1967). Vitellogenesis in the horseshoe crab *Limulus polyphemus.* – J. Microscopie *6,* 791–806.

Duspiva, F. (1969). Molekularbiologische Aspekte der Entwicklungsphysiologie. – Naturw. Rdsch. *22,* 191–202.

Engelmann, F. (1969). Female specific protein: biosynthesis controlled by Corpora allatum in *Leucophaea maderae.* – Science *165,* 407–409.

Engels, W. & Bier, K. (1967). Zur Glykogenspeicherung während der Oogenese und ihrer vorzeitigen Auslösung durch Blockierung der RNS-Versorgung (Untersuchungen an *Musca domestica* L.). – Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. *158:* 64–88.

Engels, W. & Drescher, W. (1964). Einbau von H^3-D-Glucose während der Oogenese bei *Apis mellifica* L. – Experientia *20,* 445–446.

Favard-Séréno, C. (1964). Phénomène de pinocytose au cours de la vitellogenèse protéique chez le grillon (Orthoptère). – J. Microscopie *3,* 323–338.

Fawcett, Don W. (1966). The cell. An atlas of fine structure, 448 pp. – Philadelphia and London: W. B. Saunders Company.

Galun, R. & Warburg, H. (1967). Studies on the reproductive physiology of the tick *Ornithodoros tholozani* (Laboulbéne & Mégnin): The effect of mating on oogenesis. – Acta soc. zool. Bohemoslov. *31,* 329–334.

Geigy, R. & Herbig, A. (1955). Erreger und Überträger tropischer Krankheiten, 472 pp. – Acta trop. Suppl. 6. Basel: Verlag für Recht und Gesellschaft.

Goroshchenko, Y. L. (1960). The structure of a male gonad and pecularities of spermatogenesis and oogenesis in argasid ticks. – Sb. trudov. Inst. Tsitologii AN SSSR. "Voprosy tsitologii i protistologii" I, 187–196 (zitiert in Balashov, Y. S. 1964).

Goroshchenko, Y. L. (1964). Fertilization in argasid ticks. – Tsitologiya 6 (zitiert in Balashov, Y. S., 1964).

Grassé, P. O. (1949). Traité de zoologie. Tome 6: Onychophores-Tardigrades-Arthropodes-Trilobitomorphes-Chélicérates, 979 pp. – Paris: Masson et Cie.

Grundmann, E. (1964). Allgemeine Cytologie, 423 pp. – Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Hack, M. H. & Helmy, F. M. (1967). Correlative lipid histochemistry. – Acta Histochem. *27,* 74–84.

Hansen-Delkeskamp, E. (1969). Synthese von RNS und Protein während der Oogenese und frühen Embryogenese von *Acheta domestica.* – Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. *162,* 114–120.

Hay, E. D. (1968). The nucleolus in developing cells, in: The nucleus, edited by Dalton, A. J. & Haguenau, F., 244 pp. – New York and London: Academic Press.

Hecker, H., Aeschlimann, A. & Burckhardt, M. J. (1968). Contribution à la connaissance des symbiotes chez *Ornithodorus moubata* (Ixodoidea). Etude au microscope électronique. – Acta trop. *25,* 256–261.

Hill, L. (1962). Neurosecretory control of haemolymph protein concentration during ovarian development in the desert locust. – J. Insect Physiol. *8,* 609–619.

Hill, L. (1965). The incorporation of C^{14}-glycine into the protein of the fat body of the desert locust during ovarian development. – J. Insect Physiol. *11,* 1605–1615.

Hinsch, G. W. & Cone, M. V. (1969). Ultrastructural observations of vitellogenesis in the spider crab, *Libinia emarginata* L. – J. Cell Biol. *40,* 336–342.

Honegger, C. G. (1962 a). Über die Dünnschichtchromatographie von Lipiden. Untersuchungen von Gehirngewebe Multiple-Sklerose-Kranker und Normaler. – Helv. chim. Acta *45,* 281–289.

Honegger, C. G. (1962 b). Über die Dünnschichtchromatographie von Lipiden. Untersuchungen von Gehirngewebe aus der weißen Substanz Multiple-Sklerose-Kranker. – Helv. chim. Acta *45,* 2020–2029.

Honegger, C. G. & Freyvogel, T. A. (1963). Lipide des Zentralnervensystems bei Wirbeltieren und einigen Wirbellosen. – Helv. chim. Acta *46,* 2265–2270.

Hoepker, W. (1953). Über den Nucleolus der Nervenzelle. – Z. Zellforsch. *38,* 218–229.

Hopkins, C. R. & King, P. E. (1966). An electron-microscopical and histochemical study of the oocyte periphery in *Bombus terrestris* during vitellogenesis. – J. Cell Sci. *1,* 201–216.

Jacquiert, C. (1936). Recherche sur l'ontogenèse des Araignées et les corps vitellins de Balbiani, 157 pp. – Paris: Thèse Fac. Sci.

Jenni, L. (in Vorbereitung). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Aufnahme und Synthese von Proteinen während der Vitellogenese durch das Ei von *Ornithodorus moubata.*

Kessel, R. G. (1966 a). An electron microscope study of nuclear-cytoplasmic exchange in oocytes of *Ciona intestinalis.* – J. Ultrastr. Res. *15,* 181–196.

Kessel, R. G. (1966 b). Some observations on the ultrastructure of the oocyte of *Thyone briareus* with special reference to the relationship of the Golgi complex and endoplasmic reticulum in the formation of yolk. – J. Ultrastr. Res. *16,* 305–319.

Kessel, R. G. (1968 a). An electron microscope study of differentiation and growth in oocytes of *Ophioderma panamensis.* – J. Ultrastr. Res. *22,* 63–89.

Kessel, R. G. (1968 b). Electron microscope studies on developing oocytes of a coelenterate medusa with special reference to vitellogenesis. – J. Morph. *126,* 211–248.

Kessel, R. G. (1968 c). Mechanism of protein yolk synthesis and deposition in Crustacean oocytes. – Z. Zellforsch. *89,* 17–38.

Kessel, R. G. & Beams, H. W. (1963). Micropinocytosis and yolk formation in oocytes of the small milkweed bug. – Exp. Cell Res. *30,* 440–443.

Kessel, R. G. & Kemp, N. E. (1962). An electron microscope study on the oocyte, test cells and follicular envelope of the tunicate *Molgula manhattensis.* – J. Ultrastr. Res. *6,* 57–76.

King, P. E., Bailey, J. H. & Babbage, P. C. (1969). Vitellogenesis and formation of the egg chain in *Spirorbis borealis* (Serpulidae). – J. Mar. Biol. Ass. UK. *49,* 141–150.

KING, R. C. & AGGARWAL, S. K. (1965). Oogenesis in *Hyalophora cecropia*. – Growth *29*, 17–83.

KISZELY, G. & PÓSALAKY, Z. (1964). Mikrotechnische und histochemische Untersuchungsmethoden, 723 pp. – Budapest: Akadémiai Kiadó.

KORFSMEIER, K. H. (1966). Zur Genese des Dottersystems in der Oocyte von *Brachydanio rerio*. – Z. Zellforsch. *71*, 283–296.

KUEHN, A. (1965). Entwicklungsphysiologie, 591 pp. – Berlin, Heidelberg und New York: Springer-Verlag.

LAMY, M. (1967). Mise en évidence, par électrophorèse sur acétate de cellulose, d'une protéine vitellogène dans l'hémolymphe de l'imago femelle de la Piéride du Chou *(Pieris brassica* L.). – C. R. Acad. Sci. Paris *265*, 990–993.

LAUFER, H. (1960). Blood proteins in insect development. – Ann. N.Y. Acad. Sci. *89*, 490–515.

LEES, A. D. & BEAMENT, J. W. L. (1948). An egg-waxing organ in ticks. – Quart. J. micr. Sci. *89*, 291–333.

MARTIN, J. S. (1969). Studies on assimilation, mobilization and transport of lipids by the fat body and haemolymph of *Pyrrhocoris apterus*. – J. Insect Physiol. *15*, 2319–2344.

MERLE, J. (1968). Fonctionnement ovarien et réceptivité sexuelle de *Drosophila melanogaster* après implantation de fragments de l'appareil génital mâle. – J. Insect Physiol. *14*, 1159–1168.

MILLS, R. R., GREENSLADE, F. C. & COUCH, E. F. (1966). Studies on vitellogenesis in the American cockroach. – J. Insect Physiol. *12*, 767–779.

NATH, V. (1960). Histochemistry of lipids in oogenesis. In: International review of cytology IX, edited by BOURNE, G. H. & DANIELLI, J. F., 424 pp. – New York and London: Academic Press.

NETZEL, H. (1968). Die Ausprägung von Polarität und Bilateralsymmetrie in den Oocyten von *Gryllus domesticus* L. – Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. *160*, 119–166.

NIELSON, D. J. & MILLS, R. R. (1968). Changes in electrophoretic properties of hemolymph and terminal oocyte proteins during vitellogenesis in the American cockroach. – J. Insect Physiol. *14*, 163–170.

NORDENSKIOELD, E. (1909). Zur Ovogenese und Entwicklungsgeschichte von *Ixodes reduvius*. – Zool. Anz. *35*, 30–35.

ORR, C. W. M. (1964 a). The influence of nutritional and hormonal factors of egg development in the blowfly *Phormia regina* (Meig.). – J. Insect Physiol. *10*, 53–64.

ORR, C. W. M. (1964 b). The influence of nutritional and hormonal factors on the chemistry of fat body, blood and ovaries of the blowfly *Phormia regina* (Meig.). – J. Insect Physiol. *10*, 103–119.

PAN, M. L., BELL, W. J. & TELFER, W. H. (1969). Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. – Science *165*, 393–394.

PATT, D. I. & PATT, G. R. (1969). Comparative vertebrate histology, 438 pp. – New York, Evanston and London: Harper & Row, Publishers.

PEARSE, A. G. E. (1961). Histochemistry, 998 pp. – London: J. & A. Churchill, Ltd.

PEARSE, A. G. E. (1968). Histochemistry. Volume I, 759 pp. – London: J. & A. Churchill, Ltd.

RAMAMURTY, P. S. (1964). On the contribution of the follicle epithelium to the deposition of yolk in the oocyte of *Panorpa communis*. – Exp. Cell Res. *33*, 601–605.

RAMAMURTY, P. S. (1968). Origin and distribution of glycogen during vitellogenesis of the scorpion fly, *Panorpa communis*. – J. Insect Physiol. *14*, 1325–1330.

RAMAMURTY, P. S. & MAJUMDAR, U. (1967). Heterosynthetic origin of protein yolk in *Delias eucharis* (Drury). – Indian J. exp. Biol. *5*, 250–252.

RANDERATH, K. (1965). Dünnschichtchromatographie, 291 pp. – Weinheim: Verlag Chemie GmbH, 291 pp.

RAVEN, CHR. P. (1961). Oogenesis: The storage of developmental information, 274 pp. – Oxford, London, New York und Paris: Pergamon Press.

ROBINSON, L. E. & DAVIDSON, J. (1913 a). The anatomy of *Argas persicus* (Oken 1818). Part 1. – Parasitology *6*, 20–48.

ROBINSON, L. E. & DAVIDSON, J. (1913 b). The anatomy of *Argas persicus* (Oken 1818). Part 2. – Parasitology *6*, 217–256.

ROBINSON, L. E. & DAVIDSON, J. (1914). The anatomy of *Argas persicus* (Oken 1818). Part 3. – Parasitology *6*, 382–424.

ROMEIS, B. (1968). Mikroskopische Technik, 16. Aufl., 757 pp. – München, Wien: R. Oldenbourg Verlag.

ROTH, T. F. & PORTER, K. (1964). Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti* L. – J. Cell Biol. *20*, 313–332.

RUTHMANN, A. (1966). Methoden der Zellforschung, 301 pp. – Stuttgart: Kosmos-Verlag, Franckh'sche Verlagshandlung.

SAMSON, K. (1909). Zur Anatomie und Biologie von *Ixodes ricinus* L. – Z. wiss. Zool. *93*, 185–236.

SANDER, D. & VOLLMAR, H. (1967). Vital staining of insect eggs by incorporation of trypan blue. – Nature (Lond.) *216*, 174–175.

SCHEURER, R. (1969). Endocrine control of protein synthesis during oocyte maturation in the cockroach *Leucophaea maderae*. – J. Insect Physiol. *15*, 1411–1419.

SCHMIDT, W. (1962). Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über die intrazelluläre Verarbeitung von Vitalfarbstoffen. – Z. Zellforsch. *58*, 573–637.

SIAKATOS, A. N. (1960). The conjugated plasma proteins of the American cockroach. – J. gen. Physiol. *43*, 999–1030.

SMITH, D. S. (1968). Insect cells. Their structure and function, 372 pp. – Edinburgh: Oliver & Boyd.

STAHL, E. (1967). Dünnschichtchromatographie, 979 pp. – Berlin, Heidelberg und New York: Springer-Verlag.

STAY, B. (1965). Protein uptake in the oocytes of the Cecropia moth. – J. Cell Biol. *26*, 49–62.

STELLA, E. (1938). Ovogenesi e spermatogenesi di *Rhipicephalus sanguineus*. – Arch. zool. Torino *27*, 10–30.

STERBA, G. & SCHAEFFNER, H. (1965). Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der DNS in Lampenbürstenchromosomen mit NN'-Diäthylpseudoisozyaninchlorid. – Histochemie *5*, 260–278.

STICH, H. (1956). Bau und Funktion der Nucleolen. – Experientia *12*, 7–14.

STOCKINGER, L. (1964). Vitalfärbung und Vitalfluorochromierung tierischer Zellen, 96 pp. – Protoplasmatologia II, D1. Berlin, Heidelberg und New York: Springer-Verlag.

TELFER, W. H. (1965). The mechanism and control of yolk formation. – Ann. Rev. Ent. *10*, 161–184.

THOMAS, K. K. & GILBERT, L. I. (1967). *In vitro* studies on the release and transport of phospholipids. – J. Insect Physiol. *13*, 963–980.

THOMAS, K. K. & LAWRENCE, I. G. (1968). Isolation and characterization of the hemolymph lipoproteins of the American silk moth *Hyalophora cecropia*. – Arch. Biochem. Biophys. *127*, 512–521.

TILL, W. M. (1961). A contribution to the anatomy and histology of the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann. – Mem. ent. Soc. S. Afr. *6*, 1–124.

Van Sande, M. & Karcher, D. (1960). Species differentiation of insects by hemolymph electrophoresis. – Science *131,* 1103–1104.

Wagner, J. (1892). Die Embryonalentwicklung von *Ixodes calcaratus.* – Trav. Soc. Nat. St-Pétersbourg, Zool. & Physiol. *23,* 1–204.

Wagner-Jevseenko, O. (1958). Fortpflanzung bei *Ornithodorus moubata* und genitale Übertragung von *Borrelia duttoni.* – Acta trop. *15,* 119–168.

Wang, C. M. & Patton, R. L. (1968). The separation and characterization of the haemolymph proteins of several insects. – J. Insect. Physiol. *14,* 1069–1075.

Wang, C. M. & Patton, R. L. (1969). Lipids in the haemolymph of the cricket *Acheta domesticus.* – J. Insect Physiol. *15,* 851–860.

Wartenberg, H. (1962). Elektronenmikroskopische und histochemische Studien über die Oogenese der Amphibieneizelle. – Z. Zellforsch. *58,* 427–486.

Wartenberg, H. (1964). Experimentelle Untersuchungen über die Stoffaufnahme durch Pinocytose während der Vitellogenese der Amphibienoocyten. – Z. Zellforsch. *63,* 1004–1019.

Weber, H. (1966). Grundriß der Insektenkunde, 428 pp. – Stuttgart: G. Fischer-Verlag.

Wigglesworth, V. B. (1943). The fate of hemoglobin in *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. – Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B. *131,* 313–339.

Wigglesworth, V. B. (1964). The hormonal regulation of growth and reproduction in insects. – Adv. Insect Physiol. *2,* 247–336.

Wigglesworth, V. B. (1965). The principles of insect physiology, 546 pp. – London: Methuen.

Wilkens, J. L. (1968). The endocrine and nutritional control of egg maturation in the fleshfly *Sarcophaga bullata.* – J. Insect Physiol. *14,* 927–943.

Williams, J. (1965). Chemical constitution and metabolic activities of animal eggs, in: The biochemistry of development, Vol. 1, edited by Weber, R., 648 pp. – New York and London: Academic Press.

Wlodawer, P. & Lagwinska, E. (1967). Uptake and release of lipids by the isolated fat body of the wax moth larva. – J. Insect Physiol. *13,* 319–331.

Yalvac, S. (1939). Histologische Untersuchungen über die Entwicklung des Zekkenadultus in der Nymphe. – Z. Morph. Oekol. Tiere *35,* 535–585.

Résumé

L'ovogénèse d'*O. moubata* a été divisée en 4 périodes.

Pendant la première phase, le noyau de l'œuf accomplit, après la dernière division ovogoniale, la prophase de la mitose hétérotypique jusqu'au stade diacinèse.

Au cours de la deuxième période (prévitellogénèse), le noyau se transforme en un « noyau végétatif » euchromatique. Il possède un nucléole vacuolisé qui participe à l'élaboration des nombreux ribosomes nécessaires. Le noyau, le nucléole et le cytoplasme augmentent considérablement de volume. A la fin de la prévitellogénèse, l'ovocyte I, fortement basophile, fait saillie dans l'hémocoele. Il est relié à la paroi ovarienne par une bande cellulaire étroite et allongée, le funicule.

Pendant la troisième période (vitellogénèse), le vitellus et l'enveloppe de l'œuf se forment. Des recherches histochimiques et chromatographiques montrent du glycogène et des vacuoles contenant des triglycérides entre les grains de vitellus. Les grains de vitellus se composent d'hémo-glyco-lipoprotéines. Celles-ci contiennent de l'hématine, des triglycérides, des phospholipides, de la cholésterine et des esters de cholésterine. Il semble qu'une partie des protéines de réserve soit

formée en dehors de l'ovocyte. Des recherches électrophorétiques et immunologiques démontrent l'apparition dans l'hémolymphe de deux « protéines femelles » (hémo-glyco-lipoprotéines), pendant la vitellogénèse. Elles forment dans l'œuf la plus grande partie du vitellus. Elles y sont probablement transportées par micropinocytose (Aeschlimann & Hecker, 1967 et 1969). L'ingestion rapide de Bleu trypan montre la capacité de l'œuf d'absorber des substances à haut poids moléculaire. La coque, formée par l'œuf, est composée de protéines acides. Le noyau, situé à la périphérie de l'ovocyte, près du funicule, se ratatine vers la fin de la vitellogénèse. La membrane nucléaire et le nucléole se désintègrent.

La quatrième période dure de l'ovulation jusqu'à la ponte. Les œufs tombent dans la lumière de l'ovaire. La fécondation a probablement lieu dans les voies génitales supérieures. Après le passage dans l'oviducte, l'œuf augmente de volume, en absorbant de l'eau. La coque jusqu'à présent molle, se durcit. L'œuf prend une forme ellipsoïdale. La polarité de l'œuf s'exprime, d'une part par la position du noyau près du funicule, d'autre part par l'amas de symbiotes situé à l'opposé, sous la coque. Cette disposition représente l'axe dorsoventral de l'embryon alors que son axe céphalo-caudal correspond au grand axe de l'œuf.

Summary

The oogenesis of *Ornithodorus moubata* is subdivided in four periods.

1. period: After the last oogonial division the egg-nucleus passes through the prophase of the first meiotic division to diakinesis. The volumes of the nucleus and the cytoplasm are not markedly changed.

2. period (previtellogenesis): The egg-nucleus is transformed in an active, euchromatical "working nucleus". Histochemically DNA is not demonstrable. A prominent nucleolus is formed which takes part in the formation of ribosomes required in great quantities by the egg-cytoplasm. The nucleolus develops a big central acidophilic vacuole and many little acidophilic vacuoles in the basophilic cortex. Little basophilic spherical granules are seen in the nucleoplasm. They are thought to be derived from the basophilic part of the nucleolus. They may be an intranuclear storage- or transportform of ribosomal material. This ribosomal material is probably passing through pores in the nuclear membrane into the egg-cytoplasm (Aeschlimann & Hecker, 1967 and 1969). During previtellogenesis the volumina of the nucleus, the nucleolus and the cytoplasm increase greatly. At the end of the phase 2 the basophilic oocyte projects into the hemocoel. It is connected with the ovarian tissue only through a small elongated cell-band (funiculus).

3. period (vitellogenesis): During vitellogenesis deposition of the yolk and of the egg-shell occurs. Histochemical investigations and thinlayer-chromatography reveal glycogen and lipidfilled vacuoles (triglycerides) between the yolk spheres. The yolk spheres consist of hemo-glyco-lipoproteins containing hematin, triglycerides, phospholipids, cholesterol and cholesterol esters. Electrophoretical and immunological investigations indicate that at least a part of the yolk proteins is formed outside the oocyte. During vitellogenesis two female proteins (hemoglyco-lipoproteins) appear in high concentrations in the hemolymph. They are also demonstrable in the yolk spheres where they are forming the major bulk of the yolk proteins. They are probably taken into the oocyte by micropinocytosis (Aeschlimann & Hecker, 1967 and 1969). The fast incorporation of trypan blue shows also the oocyte's capacity to ingest substances of high molecular weight. The egg-shell is formed by the oocyte itself and consists of acid proteins. The egg-nucleus lies at the periphery near the funiculus. Towards the end of vitellogenesis the nucleus shrinks. The nuclear membrane and the nucleolus

disappear. The symbionts become concentrated in a region near the egg-periphery opposite to the funiculus.

4. period: The fourth phase lasts from the ovulation to the egg-deposition. It is supposed that fertilization takes place in the upper part of the oviduct although the penetration of the spermatozoon into the egg could not be seen. The observed chromosomal figures in eggs of the distal oviduct and of the uterus probably indicate meiotic and fertilization phenomena. In the distal oviduct, after the passage of the ampulla, the egg begins to enlarge due to waterabsorption. At the same time the previously soft egg-shell begins to harden by an unknown process. The egg shows a polarity expressed by the nucleus situated near the funiculus and by the accumulation of symbionts at the opposite side near the egg-periphery. This axis corresponds approximately to the dorsoventral axis of the embryo. The major axis of the egg which has the shape of a prolate spheroid coincides nearly with the cephalo-caudal axis of the embryo.

Curriculum vitae

Am 21. Dezember 1943 wurde ich, Peter Allan Diehl, von Degersheim/SG, als Sohn des Dr. sc. nat. Ernst Diehl, Geologe, wohnhaft in Breitenbach/SO, und seiner Gattin Isabelle geb. Kensett in Breitenbach/SO geboren. In Büsserach besuchte ich die Primarschule, in Breitenbach die Bezirksschule und anschließend in Basel das Mathematisch-Naturwissenschaftliche Gymnasium. Im Frühling 1963 bestand ich die Maturitätsprüfung. Anschließend wurde ich an der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel immatrikuliert und nahm mein Studium in Zoologie als Hauptfach, Botanik, Chemie und Bakteriologie-Hygiene als Nebenfächer auf.

Während meiner Studienzeit besuchte ich Vorlesungen und Kurse folgender Herren Professoren und Dozenten: A. Aeschlimann, H. Annaheim, H. Erlenmeyer, S. Fallab, E. Flückiger, T. Freyvogel, M. Geiger-Huber, R. Geigy, C. Grob, C. G. Honegger, E. Lang, H. Löffler, H. Nüesch, A. Portmann, M. Reiff, H. Seiler, R. Schenkel, W. Stingelin, Ch. Tamm, J. Tomcsik, H. Zoller.

Die vorliegende Dissertation entstand am Schweizerischen Tropeninstitut unter der Leitung der Herren Prof. Dr. R. Geigy und PD Dr. A. Aeschlimann.

Allen meinen Lehrern möchte ich für ihre wertvollen und vielfältigen Anregungen während meiner Studienzeit danken.